



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior Agrária de Coimbra

A toxicidade de produtos químicos em espécies de colêmbolos. Será que a forma de vida influencia?



João Rodolfo da Silva Pontes, nº 21227003



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Gestão Ambiental

Fontes das imagens da capa:

Folsomia candida:

www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=folsomia+candida&searchTax=

Ceratophysella sigillata:

www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=701453

Arrhopalites caecus:

www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=469261

Lista de Abreviaturas

Arrhopalites caecus – *A. caecus*

Centímetro – cm

Ceratphysella sigillata – *C. sigillata*

Concentração efetiva em 50% da população – EC 50

Folsomia candida – *F. candida*

Food and Agriculture Organisation – FAO

Grama – g

Graus celsius ou centígrados – °C

International Organisation for Standardization – ISO

Metro – m

Metros cúbicos – m³

Miligramma – mg

Miligramma de substância ativa por quilograma de substrato ou partes por milhão – mg/kg

Milímetros – mm

Nível de significância ou erro de primeira espécie – α

Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico – OCDE

Quilómetro – km

Substância ativa – s. a.

Valor prova – p

Índice

Resumo.....	x
Abstract	xii
Logística e suporte do trabalho realizado	xiv
Capítulo I – Introdução Geral	15
I.1 – A ecotoxicologia na avaliação do risco ambiental.....	16
I.1.1 - Breve abordagem ao uso de Pesticidas	17
I.1.2 - Breve abordagem à contaminação de metais pesados no solo.....	18
I.2- A subclasse dos colêmbolos.....	20
I.2.1- Espécies de colêmbolos usadas	21
I.3 - Ensaio ecotoxicológico em laboratório.....	23
I.4-Objetivos	29
I.5-Estrutura da tese.....	30
I.6-Referências bibliográficas	31
Capítulo II – Será que a sensibilidade de colêmbolos <i>Folsomia candida</i> de culturas de laboratório é representativa dos organismos da mesma espécie em campo?	41
II.1-Resumo	42
II.2-Introdução.....	44
II.3-Material e Métodos	49
II.3.1-Solo teste e contaminantes usados	49
II.3.2-Organismos teste	50
II.3.3-Preparação do solo para os ensaios ecotoxicológicos.....	51
II.3.4-Ensaio de reprodução com <i>Folsomia candida</i> de campo e de laboratório	52
II.3.5-Análise estatística	53
II.4-Resultados.....	54
II.4.1-Reprodução durante a exposição ao gradiente de Cobre	55
II.4.2-Reprodução durante a exposição ao gradiente de Montana (s.a. glifosato).....	57
II.4.3-Reprodução durante a exposição ao Dursban (s.a. Clorpirifos)	59
II.5-Discussão.....	61
II.6-Conclusões	64
II.7-Referências bibliográficas	65
Capítulo III – Estudo das espécies de colêmbolos <i>Cerathophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i> para ensaios de reprodução em laboratório	68
III.1-Resumo	69

III.2-Introdução.....	71
III.2.1-A espécie <i>Ceratophysella sigillata</i>	73
III.2.3-A espécie <i>Arrhopalites caecus</i>	76
III.2.4-Objetivos	77
III.3-Material e Métodos	79
III.3.1-Obtenção e manutenção das culturas/populações	79
III.3.2-Estratégia para Sincronização de culturas em laboratório	80
III.3.3-Distinção de sexo em culturas da espécie <i>Ceratophysella sigillata</i>	81
III.3.4-Determinação do período teste mais adequado para ensaios de reprodução com <i>Ceratophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i> em laboratório terminando o ensaio com a técnica usada em ensaios de reprodução com <i>Folsomia candida</i>	82
III.3.5- Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com <i>Ceratophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i> recorrendo ao extractor de MacFayden	84
III.3.6-Análise Estatística	85
III.4-Resultados.....	87
III.4.1-Sincronização de culturas das espécies <i>Ceratophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i>	87
III.4.2-Distinção de sexo em culturas da espécie <i>Ceratophysella sigillata</i>	87
III.4.3-Avaliação da durabilidade de ensaios ecotoxicológicos de reprodução para culturas das espécies <i>Ceratophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i> terminando o ensaio com a técnica usada em ensaios de reprodução com <i>Folsomia candida</i>	88
III.4.4-Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com <i>Ceratophysella sigillata</i> e <i>Arrhopalites caecus</i> recorrendo ao extractor de MacFayden	88
III.5-Discussão.....	91
III.5.1-Sincronização de culturas das espécies <i>C. sigillata</i> e <i>A. caecus</i>	91
III.5.2-Distinção de sexo nas culturas da espécie <i>C. sigillata</i>	92
III.5.3-Avaliação do período teste mais adequado para ensaios de reprodução com <i>C. sigillata</i> e <i>A. caecus</i> terminando o ensaio com a técnica da água com a tinta azul92	
III.5.4- Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com <i>C. sigillata</i> e <i>A. caecus</i> recorrendo ao extractor de MacFayden	93
III.6-Conclusões	95
III.7-Referências bibliográficas	97
Capítulo IV – Considerações Finais.....	99
IV.1-Conclusões finais	100

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Folsomia candida</i>	50
Figura 2 – Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de campo (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de cobre no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg Cu/kg; C1 – 50 mg Cu/kg; C2 – 100 mg Cu/kg; C3 – 200 mg Cu/kg; C4 – 400 mg Cu/kg; C5 – 800 mg Cu/kg; C6 – 1600 mg Cu/kg; C7 – 3200 mg Cu/kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	55
Figura 3 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de laboratório (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de cobre no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg Cu/kg; C1 – 50 mg Cu/kg; C2 – 100 mg Cu/kg; C3 – 200 mg Cu/kg; C4 – 400 mg Cu/kg; C5 – 800 mg Cu/kg; C6 – 1600 mg Cu/kg; C7 – 3200 mg Cu/kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	56
Figura 4 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de campo (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de glifosato no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,135 mg s.a./kg; C2 – 0,27 mg s.a./kg; C3 – 0,54 mg s.a./kg; C4 – 1,08 mg s.a./kg; C5 – 2,16 mg s.a./kg; C6 – 4,32 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	57
Figura 5 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de laboratório (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de glifosato no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,135 mg s.a./kg; C2 – 0,27 mg s.a./kg; C3 – 0,54 mg s.a./kg; C4 – 1,08 mg s.a./kg; C5 – 2,16 mg s.a./kg; C6 – 4,32 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	58
Figura 6 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de campo (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de clorpirifos no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,01125 mg s.a./kg; C2 – 0,0225 mg s.a./kg; C3 – 0,045 mg s.a./kg; C4 – 0,09 mg s.a./kg; C5 – 0,18 mg s.a./kg; C6 – 0,36 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	59
Figura 7 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de <i>F. candida</i> de laboratório (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de clorpirifos no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,011225 mg s.a./kg; C2 – 0,0225 mg s.a./kg; C3 – 0,045 mg s.a./kg; C4 – 0,09 mg s.a./kg; C5 – 0,18 mg s.a./kg; C6 – 0,36 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo para um $p \leq 0,05$	60
Figura 8 - Vista dorsal de adulto de <i>Ceratophysella sigillata</i>	73
Figura 9 - Vista lateral de adulto de <i>Arrhopalites caecus</i>	76

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ensaios ecotoxicológicos padronizados com invertebrados do solo (Van Gestel, 2012).	25
Tabela 2 - Gradientes de contaminação de Montana® (baseados na concentração de glifosato), Dursban® (baseados na concentração de clorpirifos) e Sulfato de Cobre (baseados na concentração de Cu) usados nos ensaios de reprodução com colêmbolos <i>Folsomia candida</i> de campo e de laboratório.....	51
Tabela 3 - Parâmetros do solo usado para o ensaio.	54
Tabela 4 - Valores de EC50 estimados para <i>F. candida</i> de campo e laboratório para os diferentes contaminantes estudados. Valores expressos em mg/kg.	61
Tabela 5 - Sucessão de Morfologias de <i>Ceratophysella sigillata</i> numa floresta a 10 km a norte de Berna, Suíça a uma altitude de 640m acima do nível do mar. Adaptado de Hopkin, 1997	76
Tabela 6 - Definições dos parâmetros estudados.	80
Tabela 7 - Parâmetros analisados para culturas das espécies <i>C. sigillata</i> e <i>A. caecus</i>	87
Tabela 8 - Número médio de indivíduos adultos sobreviventes e juvenis das espécies <i>C. sigillata</i> e <i>A. caecus</i> (\pm desvio padrão, n =5) contabilizados em ensaios de reprodução em laboratório usando diferentes períodos teste (3, 4 e 6 semanas) através da técnica de contagem com água e tinta azul.	88
Tabela 9 - Número médio de indivíduos (\pm desvio padrão; n = 4) de <i>A. caecus</i> e de <i>C. sigillata</i> , extraídos pelo extractor MacFadyen em 24h e 48h, em cada um dos métodos estudados A e B (para descrição detalhada dos métodos ver em cima).	89

Agradecimentos

É com satisfação máxima que, prestes a finalizar este trabalho, posso deixar um breve registo a todos aqueles que me marcaram durante este longo e árduo percurso.

Acima de tudo não posso esquecer quem me orientou, incansável e de uma paciência infinita, o Douto Tiago Natal-da-Luz. Sem as suas dicas, o seu exemplo de rigor e profissionalismo e todo o seu apoio, mesmo nos momentos mais difíceis, este trabalho não estaria finalizado, sem dúvida!

Também o meu enorme agradecimento à Doutora Isabel Duarte, orientadora interna da instituição, que nunca me pressionou mas que, quando lhe dei o trabalho para dar o seu parecer, foi de uma rapidez e eficácia tremenda, possibilitando que este trabalho pudesse ser entregue mais rápido do que eu próprio contaria.

A toda a equipa de investigação com quem tive o prazer de poder trabalhar, alguns portugueses mas outros de outras nacionalidades, aqui fica também o meu obrigado, pelo apoio mas essencialmente por aqueles momentos partilhados, onde nunca foi descurado o profissionalismo durante todo o trabalho, mas onde sempre que dava se contava uma piada ou se confidenciava algum desabafo. Momentos que mais tarde darão boas recordações.

Gostaria também de deixar os meus agradecimentos à Fundação para a Ciência e Tecnologia, por todo o apoio através do projeto EnvironOme (PTDC/AGR-PRO/3496/2012).

Por fim, e como não poderia deixar de ser, gostaria de aqui agradecer à mulher da minha vida, a minha mãe. Uma grande mulher que sempre lutou para que um dia pudesse ver o seu filho, e passo a citar, “Doutor”. Já faltou mais, é verdade, e mesmo naqueles momentos em que tudo parece mais difícil, as forças nunca faltarão e um dia isso acontecerá. Porque quando fazemos algo por aqueles que mais amamos, a única garantia que temos é que não desistimos, nunca!

Resumo

Este trabalho, com vista à obtenção de grau de Mestre em Gestão Ambiental, teve dois objetivos principais.

O primeiro objetivo foi avaliar a comparabilidade entre a sensibilidade de organismos de culturas de laboratório de *Folsomia candida* da Universidade de Coimbra e a sensibilidade de organismos da mesma espécie recolhidas em campo (culturas de campo). Para isso, recorreu-se à realização de ensaios de reprodução com *F. candida* de culturas de laboratório e de campo utilizando um gradiente de solos contaminados com cobre, Montana (s.a. glifosato) e Dursban (s.a. clorpirifos). Foi utilizado para o efeito um solo agrícola natural como substrato e foram usados indivíduos da espécie *F. candida* recentemente recolhidos na mesma área onde o solo foi extraído. Foi observada uma toxicidade semelhante ao cobre e à s.a. clorpirifos entre os colêmbolos de laboratório e de campo. Contudo, os colêmbolos das culturas de laboratório mostraram maior sensibilidade à s.a. glifosato que os das culturas de campo.

O segundo objetivo consistiu em estudar os ciclos de vida das espécies *Arrhopalites caecus* e *Ceratophysella sigillata* – espécies de diferentes extractos do solo – e avaliar a viabilidade do seu uso em ensaios laboratoriais de reprodução. Para isso procedeu-se à avaliação dos “parâmetros temporais” considerados importantes para a sincronização das espécies e para a definição do período teste mais adequado nos ensaios de reprodução. Foi também avaliada a eficiência de diferentes técnicas de extracção dos colêmbolos (adultos e juvenis) para terminar os ensaios de reprodução. Quanto aos resultados obtidos referentes à espécie *A. caecus*, os parâmetros temporais

medidos evidenciaram valores muito semelhantes aos reportados na literatura. Já quanto à forma de extracção de colêmbolos, verificou-se que é viável usar o mesmo método usado nos ensaios de reprodução com *F. candida*. Relativamente à espécie *C. sigillata*, os parâmetros temporais medidos foram em geral mais curtos do que os reportados na literatura. Já no que toca ao método de extracção, verificou-se que a metodologia mais adequada foi a que é usada nos ensaios de reprodução com os ácaros *Hypoaspis aculeifer*.

Palavras-chave: *Folsomia candida*; ensaios de reprodução; *Arrhopalites caecus*; *Ceratophysella sigillata*.

Abstract

This work aimed at obtaining the Master degree in Environmental Management and had two main objectives.

The first objective was to evaluate the comparability between the sensitivity of *Folsomia candida* individuals from laboratory cultures of the University of Coimbra and the sensitivity of individuals from the same species but recently collected from the field. For that purpose, laboratory reproduction tests with *F. candida* from laboratory cultures (lab cultures) and *F. candida* recently collected from the field (field cultures) were performed, using a gradient of spiked soils with increasing concentrations of copper, Montana (a.i. glyphosate) and Dursban (a.i. chlorpyrifos). A natural agricultural soil collected in the same area where *F. candida* from field cultures were collected, was used as substrate. Copper and chlorpyrifos showed similar toxicities to both individuals of *F. candida* from lab and field cultures. However, collembolans from lab cultures showed higher sensitivity to glyphosate compared to that showed by collembolans from field cultures.

The second objective consisted on studying the life cycles of the *Arrhopalites caecus* and *Ceratophysella sigillata* species - species from different soil layers - and evaluating their viability to be used in laboratory reproduction tests. For that purpose, the “temporal parameters” considered important to the species synchronization and to define the most adequate time period for laboratory reproduction tests, were investigated. The most efficient method to extract collembolans (adults and juveniles) at the end of the tests was also evaluated. Concerning the results obtained for *A. caecus*, the temporal

parameters measured in this study evidenced values similar to those reported in the literature. For the extraction method, the method usually adopted to extract collembolans at the end of *F. candida* reproduction tests was the most suitable. Regarding *C. sigillata* specie, temporal parameters measured were generally shorter than those reported in the literature. Regarding extraction method, the method generally adopted to extract mites in reproduction tests with the mite *Hypoaspis aculeifer* was the one that showed higher adequacy for *C. sigillata*.

Palavras-chave: *Folsomia candida* lab; *Folsomia candida* field; reproduction tests; *Arrhopalites caecus*; *Ceratophysella sigillata*.

Logística e suporte do trabalho realizado

O presente trabalho foi realizado no laboratório de ecologia e ecotoxicologia de solos do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, com o apoio do grupo de investigação CEF – Centro de Ecologia Funcional. O trabalho foi iniciado em fevereiro de 2013, tendo terminado a sua componente experimental em janeiro de 2014. Por motivos profissionais, a componente de escrita obrigou ao prolongamento do período normal usado para a conclusão do Mestrado.

Ao longo do tempo que durou a parte experimental, tive oportunidade de contribuir no auxílio de outros projetos relacionados com ensaios ecotoxicológicos com fauna de solo, o que me permitiu ganhar alguma experiência de laboratório que foi fundamental para o sucesso do estudo desenvolvido. O trabalho de Mestrado foi financiado pelo projeto ENVIRONOME (Ref: PTDC/AGR-PRO/3496/2012).

Para finalizar, é de realçar que todos os dados apresentados nos capítulos II e III pertencem a dois artigos que serão posteriormente publicados, pelo que será necessária a adequada confidencialidade dos dados apresentados.

Capítulo I – Introdução Geral

I.1 – A ecotoxicologia na avaliação do risco ambiental

A produção agrícola na Europa foi intensificada durante o século XX, levando ao aparecimento de problemas ecológicos (**Stoate et al., 2001; Baldock et al., 2002**). Alguns destes problemas estão relacionados com os efeitos nocivos da aplicação de pesticidas (**Santos et al., 2010**), que afetam o funcionamento dos ecossistemas através do impacto que têm, destruindo a fauna do solo e impedindo os serviços ecológicos normalmente assegurados por organismos naturalmente existentes no solo (**Frampton et al., 2006**). Segundo a **FAO** o solo é o meio onde crescem as plantas, é constituído por várias camadas (horizontes do solo), compostas por materiais minerais, orgânicos, ar e água. O solo surge da combinação das influências do clima, topografia e organismos (flora, fauna e humanos) nos materiais originais (rochas e minerais) ao longo do tempo. As propriedades do solo são a textura, estrutura, consistência, cor e as suas características químicas, físicas e biológicas. O solo é um componente essencial dos ecossistemas terrestres.

Dada esta realidade, surgem duas necessidades: 1) conhecer os efeitos dos contaminantes na fauna do solo, de modo a poder agir de forma célere à sua remoção e ao conseqüente restabelecimento dos ecossistemas (análise retrospectiva); 2) prevenir, em detrimento de remediar/corrigir, os problemas provocados por estas substâncias (análise prospectiva).

A Ecotoxicologia estuda os efeitos tóxicos de substâncias, naturais ou sintéticas, nos constituintes dos ecossistemas, animais, plantas e microrganismos (**Truhaut, 1977**), bem como os mecanismos de transporte destes agentes e as suas interações com o ambiente (**SCOPE, 1976**), tendo o objetivo de proteger a estrutura e funcionamento dos ecossistemas. Os estudos

toxicológicos são realizados em organismos teste selecionados e faz-se a extrapolação dos valores de concentração obtidos para as populações e comunidades. Na avaliação do risco ecotoxicológico de produtos químicos, os níveis seguros (níveis de contaminação que não afectam significativamente os organismos teste) são comparados com os níveis de exposição previstos ou medidos no terreno para avaliar o possível risco a que está sujeito o ecossistema exposto a determinada substância **(van Gestel, 2012)**.

I.1.1 - Breve abordagem ao uso de Pesticidas

Os pesticidas devem apresentar toxicidade selectiva destruindo os organismos alvo sem produzir efeitos nefastos em organismos não alvo que possam eventualmente sofrer exposição. Contudo, na realidade, a maioria dos tóxicos não são assim tão selectivos, podendo provocar tanto efeitos agudos (i.e, mortalidade) como crónicos (i.e, parâmetros sub-letais como crescimento e reprodução) em espécies não alvo **(Klaasen e Watkin, 2001; Palma *et al.*, 2009)**.

O uso de pesticidas na agricultura aumentou o rendimento da produção agrícola através da redução de pragas e doenças que atacavam as culturas. Após a proibição ou restrição do uso de pesticidas persistentes na década de 1970, pesticidas não-persistentes, tais como os organofosforados, foram cada vez mais utilizados **(Simões, 2005)**.

Os pesticidas são amplamente utilizados na produção agrícola devido às vantagens da sua utilização nos sistemas de agricultura intensiva praticados. Contudo, o seu uso pode trazer problemas nefastos para os ecossistemas terrestres, pelo que se deve ter imenso cuidado no seu uso **(Barroso, 2009)**.

Neste estudo foram utilizados pesticidas com base nas substâncias ativas (s.a.) clorpirifos e glifosato.

O clorpirifos é um inseticida que pertence à classe de pesticidas organofosfatos, que exercem a sua toxicidade através da ligação à acetilcolinesterase, inibindo a ação desta enzima (que conduz à acumulação de acetilcolina) e provocando uma hiperactividade dentro das vias neuromusculares **(Savolainen, 2001)**. Por outro lado, o glifosato, é um herbicida sistémico, que inibe o crescimento das plantas através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima fosfato-5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase, e é usado contra espécies perenes de raízes profundas e plantas anuais de folha larga **(Williams et al., 2000; Siimes et al., 2006)**.

I.1.2 - Breve abordagem à contaminação de metais pesados no solo

Nas últimas décadas, a intensificação das atividades humanas, tais como mineração, fundição, galvanoplastia e combustão de carvão resultou numa ampla gama de novos problemas ambientais.

Entre estes tem sido a geração generalizada de enormes quantidades de solos contaminados por metais pesados, cuja descontaminação constitui um dos principais desafios a nível global **(Boularbaha et al., 2006)**. Foram identificados muitos locais contaminados por metais pesados **(Dermont et al., 2008)**. Nos Estados Unidos, os metais pesados prevalecem em elevadas percentagens em diferentes locais e existem mais de 50 milhões de m³ de solos contaminados por metais pesados **(USEPA, 2004)**. Na Europa, solos contaminados por metais pesados englobam vários milhões de hectares,

representando cerca de 37,3% do solo total contaminado **(EEA, 2014)**. Tendências semelhantes são também encontradas na China, onde 16,1% do solo está comprovado como sendo contaminado, principalmente, por metais pesados, e em regiões caracterizadas por empresas altamente poluentes, terrenos baldios industriais, parques industriais e áreas de mineração, onde os níveis de contaminação podem ser elevados **(Ministério da Protecção do Ambiente e do Ministério da Terra, 2014)**.

A mobilidade e a biodisponibilidade de metais são afetadas significativamente pelo tamanho e composição das partículas do solo (textura). Frações finas do solo podem absorver mais contaminantes do que areia grossa por causa das suas áreas superficiais específicas serem maiores **(Liao et al., 2016)**. Em geral, a adsorção elementar (em especial dos metais pesados) aumenta com a diminuição de tamanho dos agregados **(Zhang et al., 2003)**.

Neste estudo será usado o Cobre como representante da contaminação de metais pesados no solo.

I.2- A subclasse dos colêmbolos

A subclasse Collembola (colêmbolos) é constituída por pequenos artrópodes ápteros e hexápodes e podendo ser encontrados em todo o mundo. Vivem no solo, em árvores, troncos em decomposição e em variadíssimos outros locais. Possuindo aproximadamente 7.900 espécies, pertencem ao reino *Animalia*, filo *Arthropoda*, subfilo *Hexapoda* e classe *Entognatha*.

Os colêmbolos estão entre os artrópodes mais abundantes na Terra com uma longa história evolutiva (**Engel, 2004**). A maioria das espécies consome fungos no solo, mas eles têm sido irradiados em muitos nichos, a partir da zona litoral até zonas de montanha, sendo particularmente abundantes em epífitas de florestas tropicais (**Hopkin, 1997**).

Os colêmbolos são parte integrante dos ecossistemas do solo e são vulneráveis aos efeitos de contaminação do solo (nomeadamente a pesticidas e metais pesados). A abundância e diversidade de colêmbolos fez com que estes organismos fossem amplamente utilizados para avaliar o impacto ambiental de uma série de poluentes em solos. No entanto, os efeitos de campo são difíceis de reproduzir em laboratório. As atividades antrópicas e a necessidade de controlo mais rígido sobre as emissões de resíduos e químicos no solo têm levado à busca de espécies para realizar ensaios biológicos em laboratório. As respostas destes organismos à presença de produtos químicos no laboratório podem ser usadas para avaliar a toxicidade e dar a informação necessária para criação de documentos legislativos (**Van Straalen, 2002a; Van Straalen, 1997; Van Straalen, 2002b**).

Neste estudo usaram-se três espécies diferentes da ordem Collembola, nomeadamente *Folsomia candida*, *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus*.

I.2.1- Espécies de colêmbolos usadas

O género *Folsomia* (Denis, 1931) pertence à família *Isotomidae*. A descrição original de *F. candida* por Willem (1902) foi baseada num único espécime que flutuava numa poça numa caverna em Rochefort, na Bélgica. A espécie tem entre 1,5 a 3,0 mm de comprimento na maturidade, de cor branca ou ligeiramente amarelada.

Folsomia candida pode habitar também em sistemas agrícolas, solos com um elevado teor de matéria orgânica, florestas e margens de riachos. Num estudo da diversidade de colêmbolos realizado em florestas na Escócia, *F. candida* foi a espécie mais numerosa no habitat estudado (Krivtson *et al.*, 2003).

Segundo Fountain (2005), as populações de *F. candida* reproduzem-se quase exclusivamente por partenogénese. A 20°C demoram entre 21 e 24 dias para chegar à fase de maturação sexual. Colocam cerca de 30 a 50 ovos em cada postura, e cada ovo leva 7 a 10 dias para eclodir. Os ovos são brancos, de forma esférica e de diâmetro entre 80 a 110 micrómetros. Ovos mantidos acima de 28°C deixam de eclodir, sendo essa temperatura inviável para a manutenção da cultura. A temperatura ideal para incubação de sucesso é de 21°C. A temperaturas mais baixas, o intervalo de tempo para cada fase do desenvolvimento é estendido. Por exemplo, a média de vida de uma fêmea a 15°C é de 240 dias, enquanto a 24°C é apenas 111 dias. Aos 15°C, 21°C e

27°C, o número médio de ovos postos por uma fêmea durante a sua vida é cerca de 1100, 900, e apenas 100 (**Hopkin, 1997; Wiles et al., 1998**), respectivamente.

O solo é muitas vezes considerado um ambiente estável. No entanto, as camadas superficiais estão sujeitas a largas flutuações de temperatura e humidade. Os níveis de oxigénio e dióxido de carbono podem ser variáveis onde *F. candida* sobrevive. No entanto, todas as fases da vida de *F. candida* são bem adaptadas às condições de solo seco (**Hilligsoe, 2003**). A espécie possui adaptações fisiológicas contra a dessecação e absorve o vapor de água permanecendo ativa abaixo de 98,9% de humidade relativa.

Os indivíduos da espécie *Ceratophysella sigillata* (**Uzel, 1981**), da família Hypogastruridae, são caracterizados por possuírem um ciclo de vida que inclui quatro tipos de polimorfismos diferentes cada um correspondendo a uma fase diferente (**Zettel, 1994b**). São espécies onde não há garantia do tipo de reprodução ser assexuada por partenogénese, ou ser sexuada (**Zettel, 1994a**). São organismos bastante ativos, saltando bastante, principalmente em determinadas fases do seu ciclo de vida (**Zettel, 1994b**).

A espécie *Arrhopalites caecus* (Tullberg), da família Arrhopalitidae (Stach, 1956), foi inicialmente descrita e estudada por **Tullberg (1871)** e **Boerner (1906)** e tem sido encontrada em cavernas na Europa e na América do Norte (**Christiansen, 1966**). O género *Arrhopalites* é uma das formas mais generalizadas de *Collembola* nas cavernas, dentro da região holarctica (**Vandel, 1965**). **Christiansen e Bellinger (1980, 1998)** relataram a descoberta

de *Arrhopalites caecus* em Custer County, Dakota do Sul, tal como **Moore et al. (1996)**.

Trata-se de uma espécie que se reproduz por partenogénese (**Moore et al., 2005**).

I.3 - Ensaios ecotoxicológicos em laboratório

São recomendados diversos critérios para os ensaios ecotoxicológicos (**Van Gestel et al., 1997**). Estes critérios incluem, entre outros:

1. Serem práticos, referindo-se à viabilidade e à relação custo-eficácia de um teste;
2. A aceitabilidade, incluindo aspectos como padronização, reprodutibilidade e validade estatística de um método de teste, bem como a sua ampla capacidade de resposta química, isto é, a capacidade de responder a diversos problemas referentes a um determinado grupo de problemas e não só àquele problema em específico;
3. Significado ecológico, incluindo a sensibilidade e o realismo ecológico do método de ensaio.

Para se obter uma bateria de testes equilibrada, devem ser levados em consideração os seguintes critérios (**Van Gestel et al., 1997**):

1. Representatividade para o ecossistema, de modo a salvaguardar a sua proteção: isso inclui por exemplo, o uso de organismos com nichos ecológicos diversos, representando diferentes grupos funcionais, diferentes grupos taxonómicos e diferentes vias de exposição;

2. Representatividade das respostas, para ter a certeza se as respostas avaliadas são realmente relevantes para a protecção das populações e comunidades do ecossistema;
3. A comparabilidade, que se refere à possibilidade de aplicar todos os testes no mesmo meio do ensaio.

Tabela 1 - Ensaios ecotoxicológicos padronizados com invertebrados do solo (Van Gestel, 2012).

Organismos teste	Espécies	Duração (dias)	“Endpoint”	Guias padrão	Referências
Minhocas	<i>Esenia fetida</i> <i>Eisenia andrei</i>	14	Sobrevivência	OCDE 207 ISO 11268-1	OCDE (1984); ISO (1993)
		28 (+28)	Reprodução	ISO 11268-2 OCDE 222	ISO (1998); OCDE (2004b)
		2	<i>Avoidance</i>	ISO 17512-1	ISO (2008a)
	Outras espécies em ensaios de campo	Mais de 1 ano	Diversidade de espécies; abundância	ISO 11268-3	ISO (1999b)
Enquitreídeos	<i>Enchytraeus albidus</i> e outras espécies	21 (+21)	Sobrevivência, reprodução	ISO 16387 OCDE 220	ISO (2004); OCDE (2004a)
		2	<i>Avoidance</i>	Não existe	Amorim <i>et al.</i> (2008a, b)
Moluscos	<i>Helix aspersa</i>	28	Sobrevivência	ISO 15952	ISO (2006)
Ácaros	<i>Hypoaspis aculeifer</i>	14	Sobrevivência, reprodução	OCDE 226	OCDE (2008)
	<i>Platynothrus peltifer</i>	14 70	Sobrevivência, reprodução	Não existe	Van Gestel e Doornekamp (1998)
	<i>Oppia nitens</i>	28	Reprodução	Não existe	Princz <i>et al.</i>

Organismos teste	Espécies	Duração (dias)	“Endpoint”	Guias padrão	Referências
					(2010)
		2	<i>Avoidance</i>	Não existe	Owojori <i>et al.</i> (2011)
Isópodes	<i>Porcellio scaber</i>	28	Sobrevivência	Não existe	Hornung <i>et al.</i> (1998a, b)
	<i>Porcellionides pruinosus</i>	14	Sobrevivência, reprodução	Não existe	Jansch <i>et al.</i> (2005)
		2	<i>Avoidance</i>	Não existe	Loureiro <i>et al.</i> (2005)
Colêmbolos	<i>Folsomia candida</i> <i>Folsomia fimetaria</i>	28	Sobrevivência, reprodução	ISO 11267 OCDE 232	ISO (1999a); OCDE (2009)
		2	<i>Avoidance</i>	ISO 17512-2	ISO (2011)
Coleópteros	<i>Oxythyrea funesta</i>	14	Sobrevivência	ISO 20963	ISO (2005)

Segundo **Van Gestel (2012)** existem diferentes tipos de endpoints nos testes toxicológicos, incidindo sobrevivência, reprodução e evitamento (“avoidance”) às condições adversas a que são expostos (Tabela 1).

Nos testes de sobrevivência, e segundo as ISO para este tipo de testes (**e. g. ISO 1993**), pode observar-se que se trata de ensaios onde se avalia a capacidade dos organismos sobreviverem quando expostos a concentrações crescentes de um contaminante, sendo o contaminante considerado não tóxico nas doses onde é verificada a sobrevivência dos organismos. Segundo se pode observar a Tabela 1, os testes de sobrevivência são registados em todos os organismos aqui considerados. Contudo, há que realçar as diferenças de organismo para organismo, pelo que se torna importante realçar os 28 dias de duração para os colêmbolos. Actualmente, os testes de mortalidade realizados com colêmbolos e minhocas têm uma duração de 14 dias e têm como objetivo principal definir a gama de concentrações mais adequada aos testes de reprodução.

Os testes de reprodução avaliam a capacidade reprodutiva dos organismos quando expostos a um gradiente crescente de concentrações de uma substância, sendo os resultados representativos e passíveis de uma interpretação e discussão válidas quando é verificada a reprodução dos indivíduos gerados pelos adultos usados em teste, desde que essa reprodução gere um número de indivíduos considerável no controlo (dose sem contaminante) para não tornar o teste inválido. Os testes toxicológicos usados neste estudo foram os de reprodução e são explicados devidamente no capítulo II desta tese. Neste tipo de testes, há que realçar a sua prática nos

seguintes organismos: minhocas, enquitreídeos, ácaros, isópodes e colêmbolos.

Quanto aos testes de evitamento (“avoidance”), embora não fossem usados neste estudo, são testes de avaliação preliminar rápidos. São bioensaios que têm potencial para ser utilizados como ferramentas de diagnóstico preliminar nesta área. No solo, os ensaios de evitamento foram inicialmente desenvolvidos para minhocas (**Keogh & Whitehead, 1975**), e resultaram do facto de se ter constatado que o número de minhocas é normalmente reduzido como resultado de uma migração crescente de áreas mais contaminadas para áreas menos contaminadas.

Após a análise à Tabela 1 (e focando apenas os tipos de testes toxicológicos de reprodução em colêmbolos), é de notar que as espécies de colêmbolos consideradas para ensaios ecotoxicológicos em laboratório são todas referentes à camada hemiedáfica do solo pelo que os testes de reprodução descritos nas normas ISO e OCDE são apenas representativos dessa camada do solo.

I.4-Objetivos

Este estudo teve dois objetivos principais:

1. Comparar a sensibilidade de colêmbolos de culturas de laboratório com a sensibilidade de colêmbolos da mesma espécie mas recolhidos recentemente do campo, em testes de reprodução usando gradientes de concentrações crescentes de cobre, glifosato e clorpirifos.
2. Estudar a possibilidade de realização de testes de reprodução usando novas espécies de colêmbolos (as espécies *C. sigillata* e *A. caecus*), de modo a poder num futuro próximo tornar os estudos dos solos mais representativos em termos ecológicos.

I.5-Estrutura da tese

Este trabalho está organizado em quatro capítulos, incluindo este (capítulo I) baseado em conceitos introdutórios da temática.

O capítulo II apresenta o estudo comparativo da sensibilidade de culturas de laboratório de *Folsomia candida* com espécimes recentemente recolhidas do campo, quando sujeitas a testes de reprodução com cobre, glifosato e clorpirifos.

O capítulo III visa iniciar um novo estudo com o principal objetivo de considerar novas espécies de colêmbolos em ensaios onde atualmente se procede ao uso da espécie *F. candida*, tendo como objetivo futuro avaliar se a forma de vida influenciará os resultados a contaminantes.

O capítulo IV (último capítulo deste estudo) inclui uma conclusão geral integrando os resultados obtidos nos capítulos II e III.

I.6-Referências bibliográficas

- Amorim MJB, Novais S, Römbke J, Soares AMVM (2008a) Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): Effects of different exposure time and soil properties. Environmental Pollution 155: 112–116.
- Amorim MJB, Novais S, Römbke J, Soares AMVM (2008b) *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standard avoidance test? Effects of different chemical substances. Environment International 34: 363–371.
- Baldock D, Dwyer J, Sumpster Vinas JM (2002). Environmental Integration and the CAP. A Report to the European Commission, DG Agriculture. Institute for European Environmental Policy, London
- Barroso, Maria de Fátima Saavedra (2009). Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna*. Dissertação em Contaminação e Toxicologia Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
- Böerner, C. (1906). Das system der Collembolen, nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamberger Naturhistorischen Museums: Mitteilungen aus dem Naturhistorischen Museums Hamburg. 23, 147–188.
- Boularaba, A., Schwartz, C., Bitton, G., Morel, J.L. (2006). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. Chemosphere 63 (5), 802–810.

- Christiansen, K. (1966). The genus *Arrhopalites* (Collembola: Sminthuridae) in the United States and Canada. International Journal of Speleology. 2, 43–73.
- Christiansen, K., and Bellinger, P. (1980). The Collembola of North America, North of the Rio Grande - A taxonomic analysis. Grinnell College, Grinnell Iowa, 1322
- Christiansen, K., and Bellinger, P. (1998). The Collembola of North America North of the Rio Grande, A taxonomic analysis. Second edition: Grinnell College, Iowa, 1520
- Denis, J.R. (1931). Contributo alla conoscenza del Microgenton di Costa Rica II. Collemboles de Costa Rica avec une contribution au species de l'ordre. Bolletino del Laboratoria di Zoologia generale ed agraria della Facoltà agraria di Portici, 25: 69-170
- Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G., Richer, L.M. (2008). Soil washing for metal removal: a review of physical/chemical technologies and field applications. Journal of Hazardous Materials 152, 1–31.
- EEA (2014). Overview of contaminants affecting soil and groundwater in Europe. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/overview-of-contaminants-affecting-soil-and-groundwater-in-europe>. Visitado a 25 de agosto de 2015.
- Engel MS, Grimaldi DA. (2004). New light shed on the oldest insect. Nature 427:627–30.

- Fountain, Michelle T. e Hopkin, Steve P. (2005). *Folsomia candida* (Collembola): A “standard” soil arthropod. Annual Review Entomology. 50:201-22.
- Frampton GK, Jansch S, Scott-Fordsmand JJ, Rombke J, Van den Brink PJ (2006). Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. Environmental Toxicology and Chemistry. 25:2480–2489.
- Hilligsoe H, Holmstrup M. (2003). Effects of starvation and body mass on drought tolerance in the soil collembolan *Folsomia candida*. Journal of Insect Physiology 49:99–104
- Hopkin SP. (1997). Biology of the Springtails (*Insecta: Collembola*). Oxford, UK: Oxford University Press. 330.
- Hornung E, Farkas S, Fischer E. (1998a). Tests on the isopod *Porcellio scaber*. In: Løkke H, Van Gestel CAM (Eds) Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. John Wiley & Sons, Chichester, 207–226.
- Hornung E, Fischer E, Farkas S (1998b). Isopod reproduction as a tool for sublethal-toxicity tests. Israel Journal of Zoology 44: 445–450.
- ISO (1993). Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate ISO 11268-1. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (1998). Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. International Standardization Organization, Geneva.

- ISO (1999a). Soil Quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO 11267. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (1999b). Soil Quality – effects of pollutants on earthworms. Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations. ISO 11268-3. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (2004). Soil quality – Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Determination of effects on reproduction and survival. ISO 16387. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (2005). Soil quality – Effects of pollutants on insect larvae (*Oxythyrea funesta*) – Determination of acute toxicity. ISO 20963. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (2006). Soil quality – Effects of pollutants on juvenile land snails (*Helicidae*) – Determination of the effects on growth by soil contamination. ISO 15952. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (2008a). Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia ndrei*). ISO 17512-1. International Standardization Organization, Geneva.
- ISO (2011). Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). ISO 17512-2. International Standardization Organization, Geneva.

- Jänsch S, Garcia M, Römcke J (2005). Acute and chronic isopod testing using tropical *Porcellionides pruinosus* and three model pesticides. European Journal of Soil Biology 41: 143–152.
- Keogh R. G. & Whitehead P.H. (1975). Observations on some effects of pasture spraying with benomyl and carbendazim on earthworm activity and litter removal from pasture. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 3: 103-104.
- Klaasen, C., Watkin III, J. (2001). Toxicologia, a Ciência Básica dos tóxicos. 5ª Edição, McGraw- Hill.
- Krivtsov V, Illian JB, Liddell K, Garside A, Bezginova T, *et al.* (2003). Some aspects of complex interactions involving soil mesofauna: analysis of the results from a Scottish woodland. Ecol. Modell. 170:441–52
- Liao, X., Lu, Y., Yan, X. (2016). Removal of heavy metals and arsenic from a co-contaminated soil by sieving combined with washing process. Journal of Environmental Sciences 41, 202-210
- Loureiro, S., Soares AMVM, Nogueira AJA (2005). Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution 138: 121–131.
- Ministério da Protecção do Ambiente e do Ministério da Terra (2014). National Survey Bulletin Soil Pollution. China.
http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm.
 Visitado a 25 de Agosto de 2015.

- Moore, J.C., Clarke, J.A., Heimbrook, M.E., and Mackessy, S.P. (1996). Survey of the biota and trophic interactions within Wind Cave and Jewel Cave, South Dakota. NPS report. Report to Wind Cave National Park, Hot Springs, SD 57747, USA.
- Moore, J. C.; Saunders, P; Selby, G.; Horton, H.; Chelius, M. K.; Chapman, A. e Horrocks, R. (2005). The distribution and life history of *Arrhopalites caecus* (Tullberg): Order: Collembola, in wind cave, South Dakota. USA. Journal of Cave and Karst Studies 67, (2), 110-119.
- OECD (1984). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute toxicity tests. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2004a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 220. *Enchytraeid* reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2004b). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 222. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2008). OECD Guidelines for the testing of Chemicals 226. Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (2009). OECD Guidelines for the testing of Chemicals 232. Collembolan reproduction test in soil. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

- Owojori, O.J., Healey J., Princz J., Siciliano, S.D. (2011). Can avoidance behavior of the mite *Oppia nitens* be used as a rapid toxicity test for soils contaminated with metals or organic chemicals? Environmental Toxicology and Chemistry 30: 2594–2601.
- Palma, P., Palma, V.L., Matos, C., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M. , Barbosa, I.R. (2009). Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. Chemosphere, 74: 676–681.
- Princz, J.I., Behan-Pelletier, V.M., Scroggins, R.P., Siciliano, S.D. (2010). *Oribatid mites* in soil toxicity testing – the use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a new test species. Environmental Toxicology and Chemistry 29: 971–979.
- Santos, M.J.G., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S. (2010). Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. Chemosphere 80:1021–1030
- Savolainen, K. (2001). Understanding the toxic actions of organophosphorus. In: Krieger R (ed) Handbook of pesticide toxicology: agents. Academic Press, San Diego, 1013–1041
- Scientific Committee on Problems of the Environment. (1976). Disponível em: www.scopenvironment.org. Visitado em 25 de agosto de 2015.

- Siimes K, Raïmo S, Welling L, Nikunen U, Laitinen P (2006). Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. *Agricultural Water Management* 84:53–64
- Simões, João Santos (2005). Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação. Porto. ISBN: 972-8589-48-4.
- Stoate, C., Boatman, N.D., Borralho, R.J., Rio Carvalho, C., De Snoo, G.R., Eden, P. (2001). Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* 63:337–365
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and environmental safety* 1.2 151-173.
- Tullberg, T., (1871). Förteckning öfver svenska podurider: öfv. K. Vetakad. Förhandl 28, 143–155.
- USEPA (2004). Cleaning up the nation's waste sites: markets and technology trends. EPA 542-R-04-015 4th ed. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC.
- Van Gestel, C.A.M. (1997). Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bioassays. In: Van Straalen NM, Løkke H (Eds) *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil*. Chapman & Hall, London, 25–50.
- Van Gestel, Cornelis A. M. (2012). Soil ecotoxicology: state of art and future directions. *ZooKeys* 176: 275-296.

- Van Gestel, C.A.M, Doornekamp, A. (1998). Tests on the oribatid mite *Platynothrus peltifer*. In: Løkke H, Van Gestel CAM (Eds) Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. John Wiley & Sons, Chichester, 113–130.
- Van Straalen, N.M. (2002a). Theory of ecological risk assessment based on species sensitivity distributions. See References 87a, 37–48
- Van Straalen, N.M., Løkke H, eds. (1997). Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil. London: Chapman & Hall
- Van Straalen, N.M., Van Leeuwen, C.J. (2002b). European history of species sensitivity distributions. See References 87a, 19–34
- Vandel, A. (1965). Biospeleology: The biology of cavernicolous animals. Pergamon Press, Oxford. 425.
- Uzel, J. (1981). Supinuský zeme ceske. Vestnik Ces. Spol. Nauk, Math. Prirodov. 3-82.
- Wiles, J.A.; Krogh, P.H. (1998). Tests with the collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. In Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests, ed. H. Løkke, CAM Van Gestel, 131–56. Chichester, UK: Wiley
- Willem V. (1902). Note préliminaire sur les collemboles des grottes de Han et de Rochefort. Annales de la Société Entomologique Belge 46:275–83
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup1 and its active ingredient,

glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31:117–165.

Zettel, U. & Zettel, J. (1994a). Development, phenology and surface activity of *Ceratophysella sigillata* (Uzel) (Collembola, Hypogastruridae). Acta Zoology Fennica. 195:150-153.

Zettel, U. & Zettel, J. (1994b). Seasonal and reproductional polymorphism in *Ceratophysella sigillata* (Uzel) (Collembola: Hypogastruridae). Acta Zoology Fennica 195: 154-156.

Zhang, M., He, Z., Calvert, D., Stoffella, P., Yang, X., Li, Y. (2003). Phosphorus and heavy metal attachment and release in sandy soil aggregate fractions. Soil Science Society of America Journal 67 (4), 1158-1167

<http://www.fao.org> , visitado a 25 de agosto de 2015.

Capítulo II – Será que a sensibilidade de colêmbolos *Folsomia candida* de culturas de laboratório é representativa dos organismos da mesma espécie em campo?

II.1-Resumo

A toxicidade de compostos químicos no solo é frequentemente avaliada por meio de testes laboratoriais de reprodução seguindo normas ISO. *Folsomia candida* é uma espécie normalmente usada em ensaios ecotoxicológicos de solo. Esta espécie reproduz-se por partenogénese e a utilização de diferentes linhagens clonais pode interferir na sensibilidade destes organismos à exposição a compostos químicos. Espécimes retirados de culturas de laboratório podem representar linhagens clonais que não são representativas dos clones presentes no campo, o que pode comprometer a relevância ecológica e a fiabilidade dos resultados obtidos em testes de laboratório para avaliação de ecotoxicidade.

Com o objetivo de avaliar a comparabilidade entre a sensibilidade de organismos de culturas de laboratório de *F. candida* da Universidade de Coimbra e a sensibilidade de organismos da mesma espécie recentemente recolhidas em campo, foram realizados testes de reprodução com culturas de *F. candida* de laboratório e de campo utilizando um gradiente de solos contaminados com cobre, Montana (s.a. glifosato) e Dursban (s.a. clorpirifos). Foi utilizado um solo agrícola natural como substrato e utilizados indivíduos da espécie *F. candida* da mesma área onde o solo foi recolhido. Os ensaios de reprodução realizados demonstraram toxicidade semelhante quanto à exposição ao cobre e clorpirifos para *F. candida* de campo e de laboratório. Os valores de EC50 estimados para indivíduos de laboratório e de campo foram 543 (151-937) e 557 (150-964) mg Cu / kg, respectivamente. Os valores de EC50 estimados para a exposição ao clorpirifos em indivíduos de laboratório e de campo foram de 0,18 (0-21,0) e 0,12 (0,08-0,15) mg/kg, respectivamente.

Os resultados obtidos na exposição ao glifosato em indivíduos de laboratório e de campo não permitiram estimar o EC50. Contudo, os colêmbolos de laboratório mostraram maior sensibilidade ao glifosato comparando com os colêmbolos de campo. Em geral, os resultados obtidos mostraram que a sensibilidade de colêmbolos de culturas de laboratório é comparável à de colêmbolos de campo quanto ao cobre e ao clorpirifos. Quanto à exposição ao contaminante glifosato, é necessário realizar novos ensaios de reprodução usando um gradiente de contaminação mais elevado de modo a obter uma dose resposta que permita estimar os valores de EC50 para cada população de colêmbolos.

Palavras-chave: Sensibilidade, *Folsomia candida*, testes de reprodução, cobre, glifosato e clorpirifos.

II.2-Introdução

O uso de agroquímicos no solo pode ter consequências nefastas para os sistemas aquático e terrestre (este último ao nível do solo) afetando espécies não-alvo (**Natal-da-Luz et al., 2012**). Como tal, torna-se pertinente avaliar a toxicidade de compostos químicos no solo, sendo esta frequentemente realizada por meio de ensaios laboratoriais de reprodução seguindo a norma ISO (por exemplo, **ISO, 1999**).

Idealmente, todos os compostos químicos deveriam ser testados antes de serem expostos no meio ambiente. Entre eles, e não esquecendo o sector agrícola, que é um dos sectores mais representativos de todo o mundo por razões óbvias, são os compostos químicos existentes nos produtos fitofármacos e fertilizantes que importa considerar e onde importa realizar uma avaliação da toxicidade dos mesmos.

Os produtos fitofarmacêuticos, segundo **Diretiva 91/414/CEE**, transposta posteriormente para lei nacional, são as substâncias ativas e as preparações contendo uma ou mais substâncias ativas que sejam apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador e se destinem a:

- a. Proteger os vegetais ou os produtos vegetais de todos os organismos prejudiciais ou a impedir a sua ação, desde que essas substâncias ou preparações não estejam a seguir definidas de outro modo;
- b. Exercer uma ação sobre os processos vitais dos vegetais, com exceção das substâncias nutritivas (exemplo: os reguladores de crescimento);
- c. Assegurar a conservação dos produtos vegetais, desde que tais substâncias ou preparações não sejam objeto de disposições comunitárias especiais relativas a conservantes;

- d. Destruir os vegetais indesejáveis;
- e. Destruir partes de vegetais e reduzir ou impedir o crescimento indesejável dos vegetais;
- f. Serem utilizados como adjuvantes.

De forma mais simplificada, são produtos destinados à defesa das plantas e da produção agrícola, com excepção de adubos e correctivos; na sua composição entra uma ou mais substâncias activas responsáveis pela prevenção ou controlo dos inimigos ou organismos nocivos; podem ter várias designações, consoante os inimigos que combatem. Durante anos foram, e ainda o são hoje, designados Pesticidas, termo que engloba uma certa carga negativa não compatível com muitos dos produtos da nova geração e até com alguns antigos.

Ao considerar os produtos fitofarmacêuticos, devem distinguir-se de acordo com o tipo de organismo nocivo que visam controlar, por exemplo insecticidas e herbicidas. Dentro dos insecticidas, existem os organofosforados, como por exemplo o Dursban (s.a. clorpirifos), que, à semelhança do que já fora mencionado neste trabalho, exercem a sua toxicidade química causando hiperactividade dentro das vias neuromusculares. Relativamente aos herbicidas, devem considerar-se os herbicidas sistémicos, como por exemplo o Montana (s.a. glifosato), que inibe o crescimento das plantas através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase, usado contra espécies perenes de raízes profundas e gramas de folhas largas anuais (Williams *et al.*, 2000; Siimes *et al.*, 2006).

Dentro dos fertilizantes (por exemplo os fosfatados, azotados e sulfatados) devem ser realçados aqueles ricos em sulfatos e muito usados no solo. Um exemplo de fertilizante rico em sulfato é composto com sulfato de cobre (CuSO_4 rico em cobre no estado iónico Cu^{2+}) tendo na sua constituição o metal pesado Cobre (composto inorgânico). Segundo um estudo de **Herbert et al. (2003)**, os metais pesados (compostos inorgânicos como por exemplo o cobre) carecem de toda a atenção visto atuarem através de mecanismos específicos, realizando a substituição polar de metaloproteínas. É portanto importante avaliar também a toxicidade dos metais pesados no solo, principalmente do cobre, por ser usado de forma recorrente nas culturas agrícolas, escoando para o solo.

Para além da necessidade da avaliação da toxicidade de determinados pesticidas e fertilizantes, é também importante saber que solo usar nessa análise. Esse solo poderá ser artificial ou natural, podendo gerar dúvidas quanto à comparação entre resultados provenientes desses diferentes tipos de solo. Segundo os estudos de **Løkke e Van Gestel (1998)** e de **Fairbrother et al. (1999)** a utilização de solos naturais *in situ* parece ser mais representativa das condições de uma determinada área do que os solos naturais ou artificiais *in loco* que são utilizados na maioria das análises ecotoxicológicas (por exemplo solo OCDE). Ainda assim são realizados inúmeros ensaios laboratoriais ecotoxicológicos de reprodução em laboratório com solos naturais extraídos de determinado local ou com solo OCDE, sendo os resultados desses ensaios considerados válidos e aptos para a extrapolação com as condições reais. Pode assim entender-se que se usa normalmente solo artificial quando se pretende avaliar uma substância de um modo geral. O uso de solo

artificial permite não só ter uma ideia da toxicidade de uma substância em condições padrão, mas também comparar a toxicidade de uma substância medida em diferentes laboratórios. Já no caso de um solo natural, estamos a testar a toxicidade de uma substância num contexto particular (num solo com característica pedológicas específicas).

Existe portanto necessidade de se avaliar os efeitos dos pesticidas utilizando solos naturais, como forma de reduzir as incertezas ao realizar uma avaliação de risco ecológico de pesticidas em determinados tipos de solo. Além disso, é importante estabelecer a relevância desse procedimento, comparando os efeitos com aqueles obtidos a partir de análise de toxicidade direta, ou seja, realizar o teste usando o solo que foi contaminado no campo, simulando um cenário real de aplicação de pesticidas (**Santos et al., 2012**). Ainda assim, o uso de solos naturais vem diminuir a possibilidade de comparação de resultados entre diferentes laboratórios de diferentes locais do planeta, visto que os resultados obtidos apenas são considerados para solos com características pedológicas semelhantes às do solo usado.

Esses organismos são mais sensíveis de modo a poder gerar um nível de exposição limite que confira alguma margem de segurança para as populações e comunidades.

Assim, tendo como objetivo a avaliação da toxicidade de substâncias químicas no solo, têm sido usadas espécies chave do ecossistema em ensaios ecotoxicológicos. Dentro dos organismos de solo, minhocas (e.g. *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*), Enquitrédeos (e.g. *Enchytraeus crypticus* e *Enchytraeus albidus*), colêmbolos (e.g. *Folsomia candida*) e ácaros (e.g. *Hypoaspis aculeifer*) têm sido os grupos mais utilizados devido à sua relevância nos

ecossistemas terrestres, facilidade de cultura em laboratório e devido aos ciclos de vida relativamente curtos (**Achazi et al., 1997, Runday et al., 1996 e Jansch et al., 2005**). Os colêmbolos são parte integrante dos ecossistemas do solo e são vulneráveis à contaminação do solo. A abundância e diversidade de colêmbolos foram amplamente utilizados para avaliar o impacto ambiental de uma série de poluentes em solos (**Fountain, 2005**). Várias espécies de colêmbolos têm sido usadas em ensaios ecotoxicológicos (**Axelsen et al., 1998, Axelsen et al., 1997**), contudo na grande maioria dos trabalhos de investigadores publicados até ao momento tem sido usada a espécie *F. candida*, tendo mesmo sido publicado em 1999 um protocolo com a descrição da metodologia que deve ser usada em ensaios com esta espécie pela International Standard Organization (**ISO, 1999**). Esta espécie reproduz-se por partenogénese e a utilização de diferentes linhagens clonais pode ter influência na sensibilidade destes organismos quando expostos a determinados compostos químicos (**Diogo et al., 2007**).

Espécimes retirados de culturas de laboratório representam linhagens clonais que podem não ser representativos de clones presentes no campo, o que poderia comprometer a relevância ecológica e a fiabilidade dos resultados obtidos em ensaios de laboratório para avaliações ecotoxicológicas.

Assim, o objetivo deste trabalho é comparar a sensibilidade de colêmbolos de culturas de laboratório *Folsomia candida* da Universidade de Coimbra com a sensibilidade de colêmbolos da mesma espécie mas recentemente recolhidos do campo em testes de reprodução usando gradientes de cobre, Montana (s.a. glifosato) e Dursban (s.a. clorpirifos).

II.3-Material e Métodos

II.3.1-Solo teste e contaminantes usados

Foi utilizado um solo natural recolhido na Escola Superior Agrária de Coimbra, concelho de Coimbra, Portugal, no mesmo local onde foi efectuada a recolha dos colêmbolos *F. candida* de campo. O solo (franco-arenoso) foi peneirado a 5 mm e desfaunado através de dois ciclos de congelamento e descongelamento (48h a 20°C seguido de 48h a 25±1°C). Os parâmetros de solo medidos foram o pH (H₂O e 1M KCl, 1:6, v:v), densidade (medida pelo aumento de volume de água após a adição de uma porção de solo previamente seco e pesado), capacidade de retenção máxima de água (WHC) **(ISO 1999)**, capacidade de troca catiónica (CTC) **(Chapman, 1965)**, o teor de matéria orgânica (MO; perda de peso depois de submetido a 500°C durante 6 horas) e a textura do solo **(LNEC, 1970)**.

Formulações comerciais de dois pesticidas diferentes foram utilizadas neste estudo como contaminantes do solo: o herbicida Montana® (30,8% s.a. glifosato) e o insecticida Dusrban® (23,5% s.a. cloropirifos).

Também foi usado Sulfato de Cobre (contendo o metal pesado cobre na sua forma iónica Cu²⁺ quando em solução).

II.3.2-Organismos teste



Figura 1 - *Folsomia candida*.

(Fonte:

www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=folsomia+candida&searchTax=)

Foram capturados indivíduos da espécie *F. candida* (Figura 1) no mesmo local onde foi recolhido o solo natural usado para os ensaios em laboratório. Para isso, recorreu-se a uma técnica que consistiu na extração de uma porção de solo e sua transferência para um recipiente que foi de seguida inundado com água para os colêmbolos ficarem a flutuar à superfície da água. Estes foram então removidos com o auxílio de uma colher e transferidos para caixas de cultura com o fundo revestido com uma mistura de gesso e carvão activado numa proporção de 11:1 (p:p). Após a sua identificação taxonómica, os colêmbolos capturados pertencentes à espécie *F. candida* foram mantidos em laboratório.

As culturas de *F. candida* extraídas do campo e outras culturas já existentes no laboratório (há mais de 10 anos) foram cultivadas em laboratório, separadamente, em caixas de plástico com o fundo revestido por uma camada de cerca de 1cm de substrato composto por uma mistura de gesso e carvão activado (na proporção de 11:1, p:p). As culturas foram mantidas a 20 ± 2 ° C, alimentadas com fermento de padeiro granulado e seco e submetidas a um fotoperíodo de 16:8h, luz:escuro.

II.3.3-Preparação do solo para os ensaios ecotoxicológicos

De início foi preparada uma solução “stock” para cada contaminante (de Montana®, Dursban® e Sulfato de Cobre) de modo a poder contaminar o solo num gradiente de concentrações crescentes para cada contaminante. Na Tabela 2 são apresentados os gradientes de contaminação usados para cada contaminante.

Tabela 2 - Gradientes de contaminação de Montana® (baseados na concentração de glifosato), Dursban® (baseados na concentração de clorpirifos) e Sulfato de Cobre (baseados na concentração de Cu) usados nos ensaios de reprodução com colêmbolos *Folsomia candida* de campo e de laboratório

	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Cobre (mg/kg)	0	50	100	200	400	800	1600	3200
Glifosato (mg/kg)	0	0,135	0,27	0,54	1,08	2,16	4,32	---
Cloropirifos (mg/kg)	0	0,01125	0,0225	0,045	0,09	0,18	0,36	---

O solo foi humedecido a 50% da sua capacidade de retenção máxima de água para todas as réplicas e o pH foi medido no início e no final de cada teste.

Os gradientes de contaminação foram preparados pela adição de

diferentes quantidades de solução “stock” em porções específicas de solo de modo a obter a concentração de contaminante desejada no solo.

II.3.4-Ensaio de reprodução com *Folsomia candida* de campo e de laboratório

Foram realizados ensaios de reprodução com *F. candida* de campo e de laboratório de acordo com os procedimentos descritos na norma ISO 11267 (ISO 1999). No início de cada experiência foram introduzidos 10 colêmbolos com 10 a 12 dias (provenientes de culturas sincronizadas) em cada frasco de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) contendo 30 g de solo (peso fresco, contaminado como explicado previamente). Foram usadas 5 réplicas por tratamento. No início e após 14 dias adicionou-se cerca de 2 mg de levedura seca e granulada em todos os frascos. Uma vez por semana, os recipientes do teste foram abertos para permitir o arejamento e adicionou-se água para repor o peso inicial nas réplicas em que a perda de peso em relação ao peso inicial foi superior a 2%.

Após 28 dias, o conteúdo de cada recipiente do ensaio foi cuidadosamente transferido para recipientes mais largos onde foi adicionada água em abundância e algumas gotas de tinta azul para aumentar o contraste entre os colêmbolos e o meio. Após agitação moderada e cuidadosa, os adultos e os juvenis – que flutuam na superfície da água – foram fotografados e contados usando o Software de análise de imagem (open source) “UTHSCSA ImageTool Version 3.0.1.”. Para cada tratamento foi preparada uma réplica adicional em tudo igual às restantes réplicas mas sem colêmbolos. Estas réplicas foram sujeitas às mesmas condições das restantes réplicas e serviu

para medir o teor em água e o pH do solo de cada tratamento no final do ensaio.

II.3.5-Análise estatística

Para cada contaminante testado e para cada cultura de *F. candida* (campo e laboratório) foi estimada a concentração subletal que provocou 50% de decréscimo na reprodução dos colêmbolos comparando com a reprodução observada no controlo (EC50). Estes valores foram determinados por meio de modelos não lineares apropriados.

O número de juvenis produzidos por *F. candida* de campo e de laboratório nas diferentes concentrações de contaminantes comparativamente com os controlos foi analisada estatisticamente através de análises de variância (ANOVAs) de uma via, seguido do teste post hoc de Dunnet considerando um α de 0,05. Antes da análise dos dados foi verificada a normalidade (através do teste de Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade de variâncias (através do teste de Bartlett) dos dados obtidos. Para todas as análises acima mencionadas, foi usado o Software “STATISTICA 7.0.”, fornecido pela StatSoft Inc.

II.4-Resultados

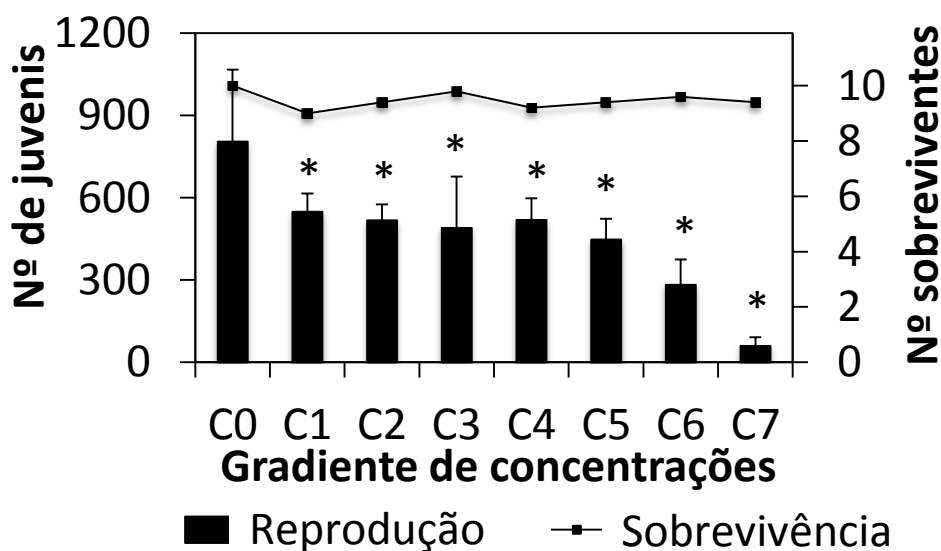
Os resultados dos parâmetros do solo avaliados, nomeadamente ao nível do tipo de solo, do pH, da capacidade de retenção e do teor de matéria orgânica podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros do solo usado para o ensaio.

Parâmetros do solo	
Tipo de Solo	franco-arenoso
pH	6,8
Capacidade de Retenção Máxima de Água (%)	36,18±0,4
Teor de Matéria Orgânica (%)	3,3±0,1

Nos ensaios de reprodução efectuados, quer para *F. candida* de campo, quer para *F. candida* de laboratório, foram cumpridos os critérios de validade definidos pela ISO (ISO, 1999): sobreviventes nos controlos >80% e número de juvenis por réplica de controlo >100 indivíduos.

II.4.1-Reprodução durante a exposição ao gradiente de Cobre



*estatisticamente menor do que o controle, $p \leq 0,05$

Figura 2 – Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de campo (média + desvio padrão, $n=5$) em função do gradiente de concentrações de cobre no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg Cu/kg; C1 – 50 mg Cu/kg; C2 – 100 mg Cu/kg; C3 – 200 mg Cu/kg; C4 – 400 mg Cu/kg; C5 – 800 mg Cu/kg; C6 – 1600 mg Cu/kg; C7 – 3200 mg Cu/kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

O cobre afectou significativamente a reprodução dos colêmbolos de campo em todas as concentrações testadas (Figura 2). Contudo, o número de adultos sobreviventes foi constante em todas as concentrações. O valor de EC50 estimado foi de 557 mg/kg (com um intervalo de confiança de 95% de 150-964 mg/kg).

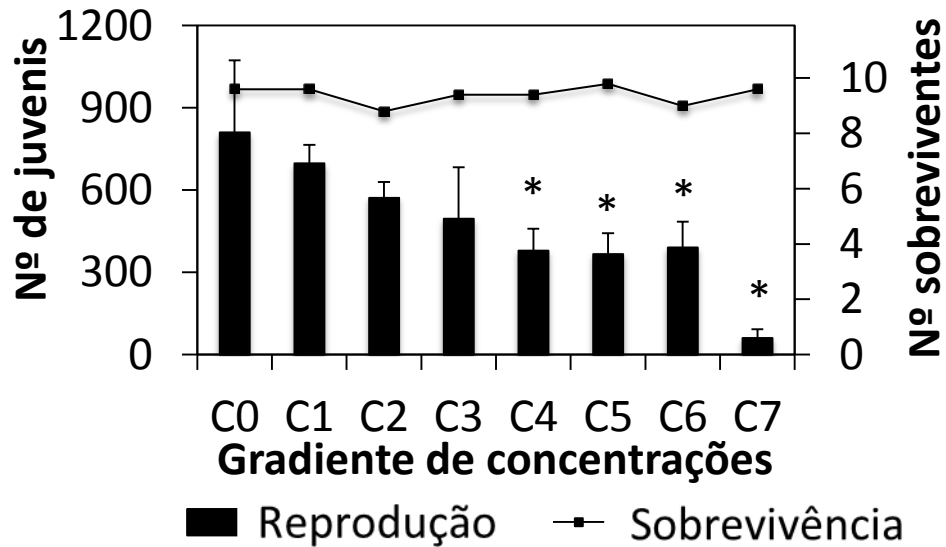


Figura 3 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de laboratório (média + desvio padrão, $n=5$) em função do gradiente de concentrações de cobre no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg Cu/kg; C1 – 50 mg Cu/kg; C2 – 100 mg Cu/kg; C3 – 200 mg Cu/kg; C4 – 400 mg Cu/kg; C5 – 800 mg Cu/kg; C6 – 1600 mg Cu/kg; C7 – 3200 mg Cu/kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

O cobre afectou significativamente a reprodução dos colêmbolos de laboratório a partir da concentração C4 (400 mg/kg; Figura 3). O número de adultos sobreviventes foi constante para todas as concentrações testadas. O valor de EC50 estimado foi de 543 (com um intervalo de confiança de 95% de 151-937 mg/kg).

II.4.2-Reprodução durante a exposição ao gradiente de Montana (s.a. glifosato)

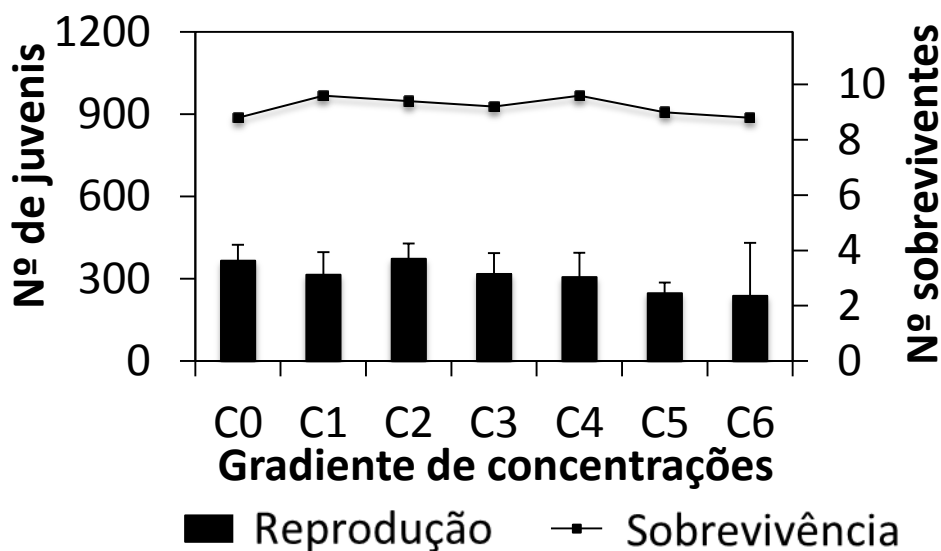
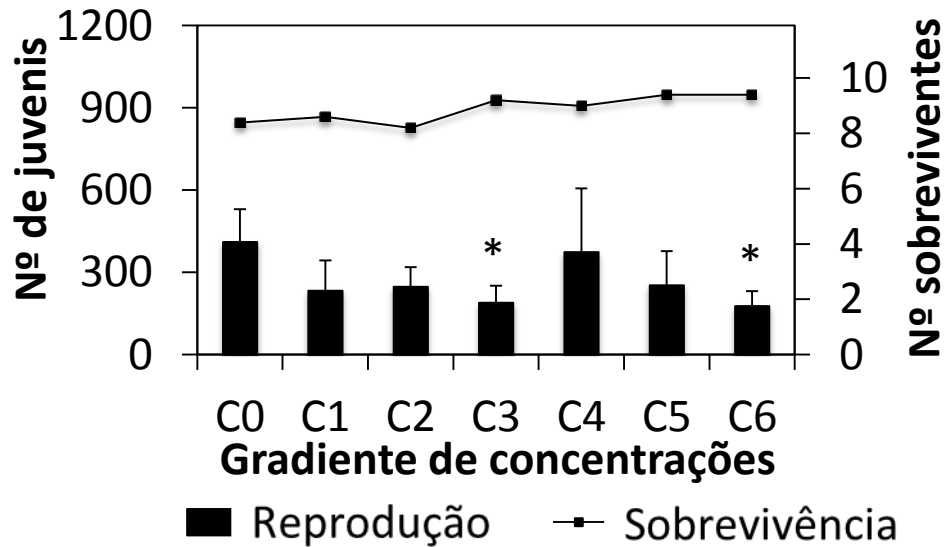


Figura 4 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de campo (média + desvio padrão, n=5) em função do gradiente de concentrações de glifosato no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,135 mg s.a./kg; C2 – 0,27 mg s.a./kg; C3 – 0,54 mg s.a./kg; C4 – 1,08 mg s.a./kg; C5 – 2,16 mg s.a./kg; C6 – 4,32 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

A reprodução dos colêmbolos de campo não foi afetada significativamente pelo glifosato em nenhuma das concentrações testadas. O número de adultos sobreviventes foi constante nos diferentes tratamentos (Figura 4). Assim, os resultados obtidos não permitiram estimar o valor de EC50 para o glifosato.



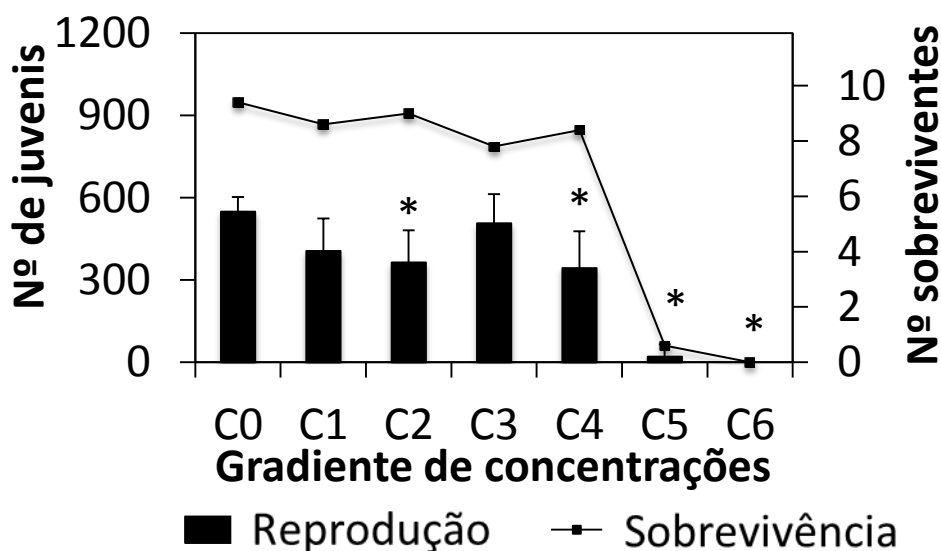
* estatisticamente menor do que o controle, $p \leq 0.05$

Figura 5 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de laboratório (média + desvio padrão, $n=5$) em função do gradiente de concentrações de glifosato no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,135 mg s.a./kg; C2 – 0,27 mg s.a./kg; C3 – 0,54 mg s.a./kg; C4 – 1,08 mg s.a./kg; C5 – 2,16 mg s.a./kg; C6 – 4,32 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

A reprodução dos colêmbolos das culturas de laboratório foi afectada significativamente apenas nas concentrações de C3 e C6. O número de adultos sobreviventes foi superior a 80% em todos os tratamentos (Figura 5).

Os dados obtidos não permitiram estimar o valor de EC50 para o glifosato.

II.4.3-Reprodução durante a exposição ao Dursban (s.a. Clorpirifos)



* estatisticamente menor do que o controle, $p \leq 0,05$

Figura 6 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de campo (média + desvio padrão, $n=5$) em função do gradiente de concentrações de clorpirifos no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,01125 mg s.a./kg; C2 – 0,0225 mg s.a./kg; C3 – 0,045 mg s.a./kg; C4 – 0,09 mg s.a./kg; C5 – 0,18 mg s.a./kg; C6 – 0,36 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

A reprodução dos colêmbolos de campo foi afetada pela exposição ao clorpirifos nas concentrações C2, C4, C5 e C6 (Figura 6). A partir da concentração C5 a sobrevivência dos adultos ao final dos 28 dias de exposição foi significativamente menor relativamente ao controle. O valor de EC50 estimado foi de 0,12 mg de clorpirifos/kg (com um intervalo de confiança de 95% de 0,08-0,15 mg/kg).

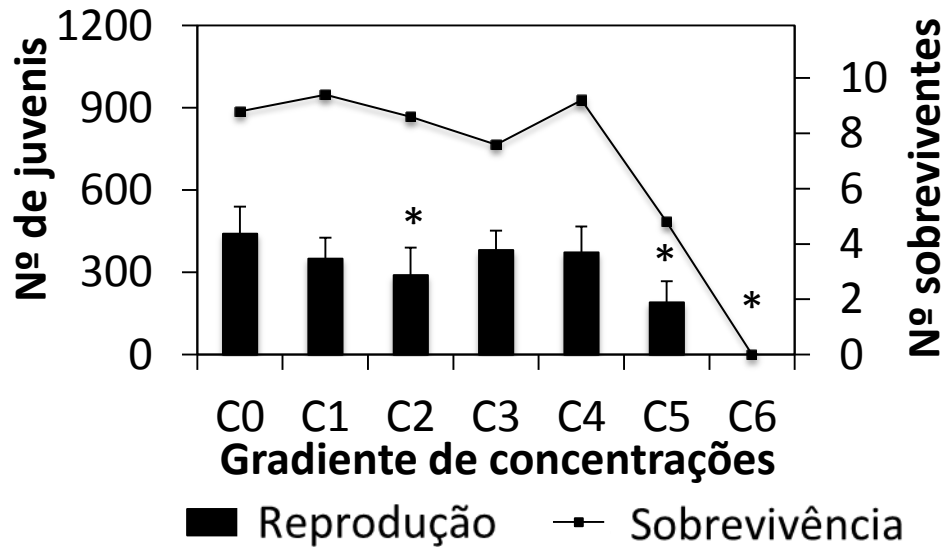


Figura 7 - Número de adultos sobreviventes e juvenis de *F. candida* de laboratório (média + desvio padrão, $n=5$) em função do gradiente de concentrações de clorpirifos no solo. Códigos das concentrações: C0 – 0 mg s.a./kg; C1 – 0,011225 mg s.a./kg; C2 – 0,0225 mg s.a./kg; C3 – 0,045 mg s.a./kg; C4 – 0,09 mg s.a./kg; C5 – 0,18 mg s.a./kg; C6 – 0,36 mg s.a./kg. * – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para um $p \leq 0,05$.

A reprodução dos colêmbolos proveniente das culturas de laboratório foi significativamente afetada nas concentrações C2, C5 e C6. A sobrevivência dos adultos foi inferior a 80% nas concentrações C3, C5 e C6 (Figura 7). O valor de EC50 estimado foi de 0,18 mg de clorpirifos/kg (com um intervalo de confiança de 95% de 0,00-21,00 mg/kg).

II.5-Discussão

Comparando a sensibilidade das culturas de *F. candida* de campo e de laboratório, verificou-se que quando expostas aos mesmos contaminantes, os colêmbolos *F. candida* reagem todos de forma semelhante. Para além da análise gráfica, também os valores estimados de EC50 comprovam tal semelhança (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de EC50 estimados para *F. candida* de campo e laboratório para os diferentes contaminantes estudados. Valores expressos em mg/kg.

Valores estimados de EC50			
Contaminantes	Cobre	Glifosato	Clorpirifos
<i>F. candida</i> campo	557 (150-964)	>>4,32*	0,12 (0,08-0,15)
<i>F. candida</i> laboratório	543 (151-937)	>4,32*	0,18 (0,00-21,00)

* - Os resultados obtidos não permitiram estimar o valor de EC50 e respectivos intervalos de confiança.

Pode observar-se que quando indivíduos de *F. candida* são expostos ao cobre, os valores estimados dos EC50 da cultura de campo e de laboratório são, respectivamente, de 557 e de 543 mg/kg. Para ambas as culturas o intervalo de confiança foi relativamente grande. Quando comparados os resultados face à exposição ao clorpirifos verificaram-se valores estimados de EC50 um pouco mais afastados, havendo uma elevada discrepância entre os intervalos de confiança para as espécies de campo e de laboratório. Quanto à exposição ao glifosato, em ambos os casos os resultados não permitiram estimar o EC50, tendo sido observada uma sensibilidade tendencialmente maior por parte dos colêmbolos de laboratório.

Num estudo desenvolvido por **Santos et al. (2012)**, a cultura de *F. candida* de laboratório apresentou valores de EC50 de 0,045mg/kg (com intervalo de confiança de 95% de 0,040-0,050) e 0,54mg/kg (com intervalo de

confiança de 95% de 0,44-0,64) para o clorpirifos e glifosato, respectivamente, usando as mesmas formulações comerciais e um solo natural com características semelhantes ao usado no presente estudo (solo agrícola mediterrânico humedecido a 60% e peneirado com malha de 5mm). Comparando esses valores com os valores estimados no presente estudo, os valores por nós obtidos foram geralmente mais elevados, sendo o EC50 do clorpirifos de 0,18 mg/kg (com intervalo de confiança de 95% de 0,00-21) e o EC50 do glifosato superior a 4,32 mg/kg. Tal disparidade nos resultados é intrigante, podendo ser devida a diferentes condições de variabilidade, nomeadamente à possível diferença da textura dos solos dos dois estudos, tal como do conteúdo em matéria orgânica dos diferentes solos. Outro fator importante a ter em consideração é o uso de valores de concentrações teóricas neste estudo, ao contrário do estudo de **Santos et al. (2012)**, onde aí os valores das concentrações foram mesmo medidas. Esse facto pode justificar os valores de concentrações mais baixos usados por nós neste estudo, muito por conta por exemplo de factores de degradação que possam ter ocorrido.

Quanto aos valores estimados de EC50 referentes ao cobre, de acordo com um estudo desenvolvido por **Løkke et al. (1998)** onde foi também usado um gradiente de sulfato de cobre o EC50 para reprodução de uma cultura de *F. candida* de laboratório foi de 658 mg/kg (não sendo possível obter mais informações quanto a este ensaio, quer a nível de valores de intervalo de confiança, quer no que refere ao tipo de solo utilizado). Outro estudo relativamente mais recente, realizado por **Herbert et al. (2003)**, indica um valor estimado de EC50 para reprodução de uma cultura de *F. candida* de laboratório de 813 mg Cu /kg (com um intervalo de confiança de 95% de 49,2-

1710). Trata-se de um estudo que envolve como substância contaminante o cloreto de cobre (CuCl_2) em vez do sulfato de cobre (CuSO_4), pese embora tratar-se igualmente de cobre na forma iónica Cu^{2+} . Contudo, o solo usado foi solo artificial segundo a norma da ISO (**ISO 1999**). Comparando os valores de toxicidade do cobre disponíveis na literatura com os valores obtidos no presente estudo, verifica-se que os valores reportados na literatura estão dentro do intervalo de confiança obtido quer para os colêmbolos de campo quer para os colêmbolos de laboratório.

Este estudo vem reforçar a credibilidade da extrapolação de resultados obtidos em laboratório para casos concretos no campo, dada a elevada semelhança entre os valores obtidos comparativamente entre *F. candida* de campo e de laboratório. Tal facto é preponderante para o sucesso na previsão de efeitos nocivos e nefastos para o meio ambiente – nomeadamente para o solo – do uso dos pesticidas Montana (s.a. glifosato) e Dursban (s.a. clorpirifos) e do Sulfato de Cobre, visto que as culturas *F. candida* de laboratório têm uma resposta a estes contaminantes bastante semelhante à resposta da mesma espécie, recolhido do campo.

Contudo, deve também notar-se o facto da durabilidade da permanência das culturas de *F. candida* de campo no laboratório, pois a partir de algumas gerações, culturas de exemplares de populações de campo expostas a condições laboratoriais podem assemelhar-se às características das já existentes em laboratório.

II.6-Conclusões

Em suma, conclui-se deste estudo que existe uma elevada representatividade das populações de *Folsomia candida* de laboratório em relação a *Folsomia candida* de campo, para estes contaminantes.

Contudo, é necessário ter especial atenção para o pesticida Montana® (s. a. glifosato), visto que os ensaios obtidos não permitiram obter qualquer toxicidade, o que não permite tirar conclusões quanto a este contaminante. Assim, há necessidade de repetir estes ensaios de modo a avaliar a sensibilidade dos colêmbolos de campo e laboratório a este contaminante.

Por fim, e para além da semelhança dos dados obtidos, são os ensaios com o contaminante Cobre que apresentam resultados mais próximos da literatura, estando os ensaios ecotoxicológicos com o herbicida Montana® e o inseticida Dursban® mais afastados dos valores reportados na literatura. Ainda assim, tal variação pode ser devida a diferentes condições de variabilidade, ao nível da textura e conteúdo de matéria orgânica do solo deste estudo face aos solos comparados pela literatura consultada ou ao uso de valores de concentrações teóricos, o que pode ter justificado o baixo valor nas concentrações usadas neste estudo. Assim, não pode ser descartada uma repetição destes ensaios, medindo as concentrações em detrimento do uso de valores teóricos consultados na literatura.

II.7-Referências bibliográficas

- Achazi RK, Chroszcz G, Mierke W. (1997). Standardization of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. Eco-Informa 12:284–89.
- Axelsen JA, Holst N, Hamers T, Krogh PH. (1997). Simulations of the predatorprey interactions in a two species ecotoxicological test system. Ecological Modelling Journal 101:15–25.
- Axelsen JA, Holmstrup M, Krogh PH. 1998. Simulation of development and reproduction of Collembola sampled from synchronized cultures. Pedobiologia 42:1–9.
- Chapman, H. (1965). Cation-exchange capacity. In Black, C.; Evans, D.; White, J.; Ensminger, L.; Clark, F. (Eds.), Methods of soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbial Properties. American Society of Agronomy, Madison, pp. 891 – 913.
- Diogo, J. B., Natal-da-Luz, T., Sousa, J. P., Vogt, C. and Nowak, C., (2007). Tolerance of Genetically Characterized Folsomia candida Strains to Phenmedipham Exposure. Journal of Soils Sediments. 7 (6) 388 – 392 (2007).
- Diretiva 91/414/CEE, de 15 de julho de 1991, referente a produtos fitofarmacêuticos. Disponível em: euro-lex.europa.eu. Visitado a 25 de agosto de 2015.
- Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N. and Tarazona, J.V. (1999). In A. Fairbrother (ed.). Test Methods for Hazard Determination of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils: Summary of

- SETAC Pellston workshop. San Lorenzo de EL Escorial, Spain: A publication of SETAC.
- Fountain, M. T. e Hopkin, S. P. (2005). Folsomia candida (Collembola): A “Standard” soil Arthropod. Annual Review Entomology 50:201-22.
- Herbert, P. D.; Cywinska, A.; Ball, S. L. e deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1512):313-21.
- ISO (1999). Soil quality—inhibition of reproduction of collembolan (Folsomia candida) by soil pollutants. ISO/DIS 11267. International Standardization Organization, Geneva.
- Jansch, S., Amorim, M. J. e Rombke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environmental Review. 13:51-83.
- LNEC (1970). Solos—Análise granulométrica por peneiração húmida. LNEC-E 239, Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa, Portugal.
- Løkke H, Van Gestel CAM (1998). Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, New York.
- Natal-da-Luz, T., Moreira-Santos, M., Ruepert, C., Castillo, L. E., Ribeiro, R. e Sousa, J. P. (2012). Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying. Ecotoxicology.
- Ronday R, Houx NWH. (1996). Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. Pedobiologia 40:106–12.
- Santos, M. J. G., Ferreira, M. F. L., Cachada, A., Duarte A. C. e Sousa, J. P. (2012). Pesticide application to agricultural fields: effects on the

reproduction and avoidance behaviour of Folsomia candida and Eisenia andrei. Ecotoxicology 21:2113-2122.

Siimes K, Raïmo S, Welling L, Nikunen U, Laitinen P (2006). Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions. Agricultural Water Management. 84:53–64.

Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup1 and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology Pharmacology Journal 31:117–165.

http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=folsomia+candida&searchTax= , visitado a 25 de Agosto de 2016.

**Capítulo III – Estudo das espécies de colêmbolos
Cerathophysella sigillata e *Arrhopalites
caecus* para ensaios de reprodução em
laboratório**

III.1-Resumo

Os ensaios ecotoxicológicos de reprodução de colêmbolos são utilizados para avaliar a toxicidade de contaminantes do solo. Atualmente, os ensaios ecotoxicológicos com colêmbolos fazem-se recorrendo à espécie *Folsomia candida*, pois é a mais estudada e mais facilmente manipulada laboratorialmente. Contudo, essa espécie é apenas representativa da zona hemiedáfica do solo, não podendo ser utilizada nas zonas epiedáfica e euedáfica. Assim, torna-se crucial estudar espécies que colonizem estas zonas do solo. Este estudo teve por objetivo estudar os ciclos de vida das espécies *Arrhopalites caecus* e *Ceratophysella sigillata* – zona epiedáfica e euedáfica do solo, respectivamente – e avaliar a sua viabilidade em ensaios ecotoxicológicos de reprodução. Para isso, procedeu-se à avaliação dos “parâmetros temporais” considerados importantes para uma adequada sincronização das espécies e definição da duração mais adequada dos ensaios ecotoxicológicos de reprodução. Foi também avaliada a eficiência das técnicas de extracção de colêmbolos (adultos e juvenis) a adoptar no final dos ensaios ecotoxicológicos de reprodução.

Relativamente aos parâmetros temporais analisados, *C. sigillata* apresentou valores bastante mais curtos no que toca ao tempo de eclosão, sendo de 9 ± 1 dias contra 3,5 semanas apresentadas na literatura. Quanto aos outros parâmetros temporais, são aqui obtidos 10 ± 2 dias para o tempo de postura e 10 dias para o tempo em que ocorre a primeira postura.

Quanto a *A. caecus*, existem muitas semelhanças entre os valores aqui obtidos e os valores de referência. O tempo de eclosão, foi de $22,2 \pm 5,2$ dias na literatura, face aos $21,5 \pm 0,5$ dias em média, obtidos neste estudo. Já o

tempo de primeira postura tem valores de referência de $5,2 \pm 2,7$ dias para a primeira geração e, neste estudo, os valores variaram entre os 9 ± 1 dias, para além das posturas seguintes terem ocorrido num período de 12 dias.

Relativamente à comparação entre as duas espécies, prevê-se que a espécie *C. sigillata* será de mais célere sincronização que a *A. caecus*. Quanto à duração do ensaio ecotoxicológico, também aqui o tempo é menor para a espécie *C. sigillata*.

No que diz respeito ao método de extracção a usar na finalização do ensaio ecotoxicológico a espécie *A. caecus* demonstrou que o ensaio ecotoxicológico pode ser terminado da mesma forma que nos ensaios com *F. candida*. Contudo, a espécie *C. sigillata* não permite terminar o método com essa técnica de contagem, tendo o método de extracção com extractor MacFayden apresentado resultados satisfatórios para futuros ensaios para continuação deste estudo.

A conclusão mais importante consiste na forte potencialidade destas duas espécies poderem ser usadas em ensaios ecotoxicológicos de reprodução em laboratório, onde atualmente se recorre à espécie *F. candida*.

Palavras-chave: Ensaio ecotoxicológicos de reprodução, *Ceratophysella sigillata*, *Arrhopalites caecus*, *Folsomia candida*, epiedáfica, euedáfica, hemiedáfica.

III.2-Introdução

A toxicidade de compostos químicos no solo é frequentemente avaliada através de ensaios de reprodução em laboratório seguindo metodologias padronizadas em protocolos da ISO (International Organization for Standardization). *Folsomia candida* é uma das espécies comumente usadas em ensaios ecotoxicológicos de solo, sendo um organismo de referência representativo da mesofauna do solo. Contudo, as características das espécies de colêmbolos são muito variáveis ao longo do perfil do solo. Para além dos colêmbolos *F. candida*, que habitam os primeiros centímetros do solo – denominados colêmbolos hemiedáficos - existem outras espécies de colêmbolos que vivem essencialmente na camada superficial de *litter* do solo - denominados colêmbolos epiedáficos - e outras espécies que vivem em camadas mais profundas do solo – denominados colêmbolos euedáficos (Byrne e Bruns, 2004). Dadas as diferenças morfológicas e fisiológicas existentes entre as espécies destes diferentes grupos ecológicos, a sensibilidade das espécies também é distinta. Como tal, para se ter uma percepção mais realista da toxicidade de contaminantes do solo na mesofauna há necessidade de utilizar, para além dos colêmbolos hemiedáficos vulgarmente usados (*F. candida*), espécies representativas de colêmbolos epiedáficos e euedáficos nos ensaios de laboratório.

Uma das espécies representativas dos colêmbolos epiedáficos existentes na Europa é *Arrhopalites caecus* (Tullberg). Esta espécie foi inicialmente descrita e classificada por Tullberg (1871) e Boerner (1906) e já foi encontrada na Europa e na América do Norte (Christiansen, 1966).

Os indivíduos da espécie *A. caecus* caracterizam-se por colocarem muitos ovos (cerca de 20 por indivíduo em cada período de postura), por possuírem uma longevidade relativamente grande (os indivíduos desta espécie normalmente duram mais tempo do que a maioria das restantes espécies de colêmbolos), e por se reproduzirem assexuadamente por partenogénese **(Moore et al., 2005)**.

Outra espécie de colêmbolos abundante na Europa é a *Ceratophysella sigillata*. Esta espécie representativa dos colêmbolos euedálicos foi descrita detalhadamente nos trabalhos publicados por **Uzel (1891)**, **Carl (1901)** e **Sachsse (1957)**. Os indivíduos desta espécie são caracterizados por possuírem um ciclo de vida que inclui quatro tipos de polimorfismo diferentes, cada um correspondendo a uma fase diferente **(Zettel, 1994a,b)**.

Os estudos sobre esta espécie publicados até ao momento não esclarecem o tipo de reprodução predominante nesta espécie, ficando a dúvida se se trata de uma espécie que se reproduz por via assexuada, sexuada ou por ambas.

No que toca à sensibilidade destas duas espécies de colêmbolos a diferentes tipos de contaminantes, não existe qualquer informação na literatura.

III.2.1-A espécie *Ceratophysella sigillata*



Figura 8 - Vista dorsal de adulto de *Ceratophysella sigillata*

(Fonte: www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=701453)

Durante o ciclo de vida da espécie *C. sigillata* (Figura 8), os indivíduos passam por vários tipos de polimorfismos perfazendo um total de 4 fases diferentes (Fases C, A, B e E). Segundo **Zettel (1994a,b)** a espécie *C. sigillata* tem um período de reprodução definido de cerca de 3 semanas, durante a primavera (Fase E). Os ovos desenvolvem-se no espaço de 3 semanas e meia quando submetidos a uma temperatura de 10°C, eclodindo assim no final de abril ou início de maio. Nos dois primeiros estádios de desenvolvimento as larvas são muito ativas a alimentarem-se, ao contrário de no terceiro estágio de desenvolvimento (Fase C). De junho a outubro dá-se a Fase C, caracterizada

por uma diapausa – dormência de verão – o que influencia uma série de características morfológicas, especialmente a cor e o tamanho (**Zettel, 1994a,b**). Posteriormente, no final de outubro entram na Fase A (quarto estágio de desenvolvimento), podendo ser distinguidos pela formação de mudas (embora a sincronização de mudas seja muito irregular por parte dos organismos, em relação às outras mudas). Ainda nesta fase permanecem inativos (sem colocar ovos) até meados de dezembro, quando reiniciam a sua atividade à superfície. A mudança para o quinto estágio ocorre no final de janeiro (Fase B). Na segunda quinzena de março pode ser observada outra mudança morfológica, para o estágio reprodutivo (sexto estágio de desenvolvimento - Fase E). Nesta fase as suas características morfológicas são bastante semelhantes às apresentadas na Fase C.

No final do seu primeiro ano de vida, um grande número de indivíduos morre durante a mudança para o estágio sete (mortalidade média de $47,6 \pm 11\%$ em comparação com $4,2 \pm 2,5\%$, referente à mudança do quinto para o sexto estágio). Os sobreviventes entram no seu segundo ano com dois estágios de desenvolvimento (7 e 8) bastante semelhantes à Fase A, mas com uma diminuição significativa no comprimento, que representa uma transição gradual para uma nova Fase C inativa (estágio 9) que se inicia a partir do fim de maio. Com base em **Cassagnau (1986)** pode considerar-se esse polimorfismo de transição como Fase B. Os estágios 7 e 8 e a sua descendência (estágio 1) são ativos na superfície. Os indivíduos no estágio 9 (Fase C), ficam no solo, enquanto os juvenis (estágio 2), são ativos na superfície. No estágio 10 (Fase A) não podem ser observados à superfície até meados de dezembro, quando as duas gerações aparecem juntas. Até ao

período de reprodução seguinte, a atividade e as mudas são altamente sincronizadas em todos os animais. Os dois grupos etários podem ser facilmente distinguidos, verificando-se nos organismos variações na sua coloração, os animais do primeiro ano são roxos e os animais do segundo ano são azul acinzentado. A composição etária das colônias pode diferir muito, onde os animais do segundo ano poderão constituir até 30% da população.

Na primavera, os indivíduos do segundo ano também entram na Fase E (estádio 12) e reproduzem-se. Ainda não se sabe se todos os animais se reproduzem no seu primeiro ano e uma parte deles faz isso pela segunda vez um ano mais tarde, ou se alguns dos animais não se reproduzem no primeiro ano fazendo-o apenas no segundo. Segundo **Zettel (1994a,b)**, em laboratório já foi observada uma reprodução bem-sucedida em 7 de 9 culturas na segunda Fase E (estádio 12) e em 7 de 10 culturas na primeira Fase E (estádio 6), sendo o número de ovos comparável (**Zettel, 1994a,b**).

Nas transições do estágio 11 para o 12 e do estágio 12 para o 13 a taxa de sobrevivência dos animais é significativamente mais baixa do que as mudas correspondentes nas gerações mais novas. Os poucos organismos que sobrevivem a esta muda entram na dormência de verão (fase C) pela terceira vez. Uma vez que o tamanho dos organismos com três anos não difere do tamanho dos organismos com dois anos, até hoje não foi confirmado se os indivíduos desta espécie podem viver por mais um ano. Na Tabela 5 é demonstrado um estudo realizado durante dois anos e meio à evolução morfológica de *C. sigillata* que de alguma forma ajuda a resumir o ciclo de estádios de desenvolvimento e as fases morfológicas por que passam os indivíduos desta espécie ao longo da vida.

Tabela 5 - Sucessão de Morfologias de *Ceratophysella sigillata* numa floresta a 10 km a norte de Berna, Suíça a uma altitude de 640m acima do nível do mar. Adaptado de **Hopkin, 1997**.

Ano 1						
Mês	Maio	Junho	Junho	Novembro	Fevereiro	Março
Estádio	1	2	3	4	5	6
Fase	A	A	C	A	A	E
Ano 2						
Mês	Abril	Abril	Maio	Novembro	Fevereiro	Março
Estádio	7	8	9	10	11	12
Fase	B	B	C	A	A	E
Ano 3						
Mês	Abril	Abril	Maio	?		
Estádio	13	14	15			
Fase	B	B	C			

III.2.3-A espécie *Arrhopalites caecus*



Figura 9 - Vista lateral de adulto de *Arrhopalites caecus*

(Fonte: www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=469261)

Segundo **Moore et al. (2005)**, *A. Caecus* (Figura 9) é uma espécie que se reproduz por partenogénese. Os seus ovos são ligeiramente alongados, medem $0,154 \pm 0,013$ milímetros e apresentam coloração branca. Tal como é típico nos ovos de Colêmbolos, os ovos escurecem com a idade. A gestação é em média de $22,2 \pm 5,2$ dias, variando de $16,2 \pm 6,3$ dias para a geração F1 e para $28,8 \pm 5,6$ dias para a geração F4, à temperatura de 21°C. Os juvenis são brancos acabando por escurecer com a idade para um bronzeado a cor de ferrugem. Os juvenis chegam a adultos passado entre $5,2 \pm 2,7$ e $20 \pm 2,8$ dias, consoante a geração, sendo o tempo menor para a primeira geração (F1) e maior para a quarta geração (F4). A reprodução das sucessivas gerações diminuiu com a redução do número de posturas tal como a quantidade de ovos postos por indivíduo por postura, sendo este estudo (**Moore et al., 2005**) realizado até à geração F4.

III.2.4-Objetivos

Dada esta realidade, o objetivo deste trabalho é estudar duas espécies de colêmbolos – *Arrhopalites caecus* (espécie epiedáfica) e *Ceratophysella sigillata* (espécie euedáfica) – ao nível do seu ciclo de vida de modo a poder obter-se informação sobre: 1) tempos das diferentes fases do ciclo de vida de modo a ser possível a manutenção de culturas de laboratório com idades sincronizadas; 2) distinção entre sexos, no caso das espécies com reprodução sexuada; 3) definição das condições ótimas de cultura e desenvolvimento de metodologias de extração e contagem de organismos de solo. Pretende-se com esta informação tornar possível o uso destas espécies em ensaios ecotoxicológicos de reprodução em laboratório semelhantes aos já usados na espécie *F. candida* e cuja metodologia está descrita em normas ISO (**ISO,**

1999). Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam ser usados no futuro em trabalhos com vista à análise da sensibilidade destas duas espécies a diferentes tipos de contaminantes através de ensaios ecotoxicológicos de reprodução em laboratório. Desta forma será possível avaliar o efeito de contaminantes em três espécies de colêmbolos representativas dos três grupos ecológicos hemiedáficos, epiedáficos e euedáficos. O uso destas três espécies de colêmbolos em cenários de avaliação de risco ecológico de contaminantes no solo irá permitir ter uma representatividade da mesofauna do solo consideravelmente maior do que é conseguido actualmente com a utilização de ensaios unicamente com *F. candida*.

III.3-Material e Métodos

III.3.1-Obtenção e manutenção das culturas/populações

Foram capturados indivíduos das espécies *C. sigillata* e *A. caecus* num campo situado no campus da Escola Superior Agrária de Coimbra, concelho de Coimbra, Portugal. Para isso, recorreu-se a uma técnica que consistiu na extracção de uma porção de solo. Esse solo foi inundado com água para os colêmbolos ficarem a flutuar à superfície da água. Estes foram então removidos com o auxílio de uma colher e transferidos para caixas de cultura com o fundo revestido com uma camada de 1 cm de mistura de gesso e carvão activado numa proporção de 11:1 (p:p). Procurou-se juntar os colêmbolos da mesma espécie nas mesmas caixas e finalmente procedeu-se à identificação taxonómica dos mesmos.

Indivíduos das espécies *C. sigillata* e *A. caecus* extraídas do campo foram cultivadas em laboratório, separadamente, em caixas de plástico com um fundo revestido por uma camada de cerca de 1cm de substrato composto por uma mistura semelhante à usada para a extracção dos colêmbolos (mistura de gesso e carvão activado na proporção de 11:1, p:p). As culturas foram mantidas a uma temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e alimentadas com fermento de pão granulado seco.

Durante esta fase, tentou-se separar os indivíduos por sexos no caso da *C. sigillata* e foram estudados os tempos de postura, o tempo de eclosão e o tempo de 1ª postura das duas espécies de colêmbolos (Tabela 6).

Tabela 6 - Definições dos parâmetros estudados.

Parâmetros temporais	Definição
Tempo de postura	Tempo que cada indivíduo leva entre duas posturas de ovos
Tempo de eclosão	Tempo médio entre a postura dos ovos e a sua eclosão
Tempo de 1ª postura	Tempo que um indivíduo demora desde a sua eclosão até à primeira postura de ovos

III.3.2-Estratégia para Sincronização de culturas em laboratório

Uma vez que as espécies *C. sigillata* e *A. caecus* não são normalmente usadas em laboratório, houve a necessidade de recorrer a dados fornecidos pela literatura para delinear a melhor estratégia para estudar as espécies individualmente. Assim, esta sub-secção descreve a estratégia adotada na realização deste estudo.

Em primeiro lugar foi avaliada a possibilidade de sincronização de ambas as espécies (*A. caecus* e *C. sigillata*) seguindo a mesma metodologia normalmente utilizada para sincronizar organismos da espécie *F. candida*. Esta abordagem é de todo o interesse, visto que se tratam de espécies selvagens que poderão não ter a capacidade de serem mantidas em condições de laboratório.

Por não haver certezas quanto ao tipo de reprodução da espécie *C. sigillata*, inicialmente procedeu-se à separação de indivíduos recém-nascidos desta espécie que, atendendo às suas características morfológicas diferentes (especialmente na cor), se julgavam poder ser de sexos diferentes. Assim, após atingir a fase de reprodução (fase E), e caso fossem e se reproduzissem por via sexuada, a separação entre machos e fêmeas ainda em recém-nascidos iria tornar impossível a postura de ovos e com isso poder-se-ia concluir que estes organismos se reproduziam sexuadamente e que

estariamos aptos a distinguir os sexos dos indivíduos à nascença. Caso mesmo após a separação dos indivíduos à nascença, continuassem a ser gerados ovos aquando da fase de postura (fase E), então ou a reprodução dos organismos seria assexuada, ou as diferenças morfológicas observadas não correspondiam a indivíduos de sexos diferentes. De notar que este procedimento não foi adotado para a espécie *A. caecus* porque existe na literatura consultada informação clara de que se tratava de uma espécie de colêmbolos que se reproduz assexuadamente (por partenogénese, **Moore et al., 2005**).

III.3.3-Distinção de sexo em culturas da espécie *Ceratophysella sigillata*

De acordo com a literatura (e.g. **Zettel, 1994a,b**) os indivíduos de *C. sigillata* podem pertencer a duas categorias, segundo características fenotípicas, referente ao tipo de reprodução. Na verdade, não há certezas quanto ao tipo de reprodução verificada por esta espécie na literatura consultada, pelo que foi necessário recorrer a características como cor e tamanho dos indivíduos recém-nascidos para poder com isso tentar testar a possibilidade de distinção entre machos e fêmeas, no caso de ocorrer reprodução sexuada. Assim, houve um trabalho diário contínuo no que toca ao isolamento dos indivíduos recém-nascidos desta espécie, aguardando depois até à fase de reprodução para assim perceber a existência de reprodução sexuada ou assexuada, sendo esta a forma escolhida para esclarecer neste estudo a dúvida gerada pela leitura dos estudos de **Zettel (1994a,b)**.

Inicialmente foram separados 20 indivíduos recém-nascidos de cada característica (arroxeados para uma caixa e brancos para outra), isto porque

inicialmente se verificou que existiam recém-nascidos com essas duas cores diferentes. Este procedimento foi repetido inúmeras vezes havendo o cuidado (principalmente a partir do momento em que se atingia a idade de reprodução dos colêmbolos) de averiguar a existência de postura por parte dos organismos. Este procedimento tinha por vista o isolamento total dos indivíduos de características fenotípicas semelhantes de modo a poder assim associar as características fenotípicas ao sexo de cada colêmbolo, podendo assim determinar o tipo de reprodução. As caixas utilizadas eram semelhantes às caixas de sincronização com meios de cultura, isto é, usaram-se caixas de plástico com o fundo revestido por uma camada de cerca de 1 cm de substrato composto por uma mistura de gesso e carvão activado (na proporção de 11:1, p:p).

III.3.4-Determinação do período teste mais adequado para ensaios de reprodução com *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus* em laboratório terminando o ensaio com a técnica usada em ensaios de reprodução com *Folsomia candida*

No início foram introduzidos 10 colêmbolos (com 8 a 10 dias para *A. caecus* e 9 a 11 dias para *C. sigillata*), provenientes de culturas com organismos de idades sincronizadas para ambas as espécies, em cada frasco de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura) contendo 30 g de solo artificial (peso fresco, sem qualquer contaminação). Foram usadas 5 réplicas por cada período teste considerado avaliado. Semanalmente adicionou-se cerca de 2 mg de levedura seca e granulada em todos os frascos contendo a espécie *C. sigillata*. Já nos frascos contendo *A. caecus* a alimentação era feita uma vez no início do teste com musgo previamente desfaunado com ciclos de congelamento e descongelamento. Uma vez por semana, os recipientes do

teste foram abertos para permitir o arejamento e adicionou-se água para repor o peso inicial nas réplicas em que a perda de peso em relação ao peso inicial foi superior a 2%. Tudo isto foi realizado muito à semelhança dos procedimentos descritos na norma ISO 11267 (**ISO 1999**), nomeadamente no que toca às condições de temperatura e fotoperíodo.

O solo utilizado foi solo artificial OCDE preparado de acordo com o protocolo 232 da OCDE (**OCDE 2009**). Para a espécie *C. sigillata* estudaram-se os períodos teste de 3 e 4 semanas, enquanto para a espécie *A. caecus* estudaram-se os períodos teste de 4 e 6 semanas. Estes períodos teste foram escolhidos de acordo com os tempos de posturas de ovos previamente observados nas caixas de cultura. No final dos testes, o método de extracção dos colêmbolos escolhido foi o usado nos ensaios de *F. candida* com água e tinta azul. Este método consiste na transferência do conteúdo de cada frasco para um recipiente mais largo onde posteriormente é adicionada água em abundância e algumas gotas de tinta azul para aumentar o contraste entre os colêmbolos que ficam à tona de água (pois não atravessam a tensão superficial da água) e o meio e assim poder proceder-se à contagem dos mesmos. A superfície da água com os colêmbolos a boiarem é fotografada de modo a permitir a contagem dos colêmbolos juvenis à superfície. Esta contagem é feita usando o Software de análise de imagem UTHSCSA ImageTool, Version 3.0 (open source). Aqui é seguida a metodologia descrita na norma **ISO** nº 11267 (**ISO, 1999**) para os ensaios de reprodução com *F. candida*.

III.3.5- Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus* recorrendo ao extractor de MacFayden

Muito por conta da determinação dos períodos adequados para ensaios de reprodução em espécies *A. caecus* e *C. sigillata*, na altura da finalização dos ensaios recorrendo à técnica usada nos ensaios de *F. candida*, surgiu a necessidade de encontrar uma técnica alternativa para finalizar ensaios principalmente para a espécie *C. sigillata*. Contudo, optou-se por estudar uma técnica de finalização de ensaios para as duas espécies. Foi então estudado o método de extração e contagem de colêmbolos baseado nos procedimentos descritos na norma da **OCDE (2008)**, para ensaios de reprodução com os ácaros *Hypoaspis aculeifer*. Este método consiste numa extração por calor utilizando um extrator MacFadyen. Para esta extração é retirada a tampa de cada réplica do teste que de seguida é revestida por uma rede de 1 a 1,5mm fixa na abertura de cada frasco por um elástico. As réplicas são depois invertidas no extrator Macfadyen para permitir a extração dos colêmbolos ao longo de vários ciclos de temperatura durante 48h. O princípio deste tipo de extração baseia-se na indução da fuga dos organismos para recipientes com álcool a 70% (v/v) através de um gradiente de calor que vai da temperatura ambiente aos 45°C. Desta forma os organismos ao fugirem das temperaturas elevadas caem num recipiente com álcool ficando assim mortos e fixados podendo posteriormente ser contados à lupa em caixas de Petri. O regime de aquecimento utilizado para a extração foi de 25°C durante 12 h, seguido de 35° C durante 12 h e 45° C durante 24 horas. Este método foi concebido para cada espécie de colêmbolos individualmente, sendo também quantificada a extração após 24 e 48 horas, para perceber se um dia de extração é suficiente para se

extrair a totalidade dos colêmbolos. Neste estudo foram usados 20 organismos entre os 10 e os 12 dias, de modo a poder verificar numa primeira fase a viabilidade desta técnica aplicada a estas espécies (de notar que a técnica foi aplicada às duas espécies, pese embora a priori estivesse em aplicar este método à espécie *C. sigillata* por se tratar da espécie onde a técnica com a tinta azul não resultou).

Surgiu a necessidade de avaliar duas possibilidades de extracção pelo extractor MacFadyen. Primeiro, definido como método de extração A, colocar o frasco do ensaio diretamente no extractor. Segundo, definido como método de extração B, colocar apenas o conteúdo, sem frasco também dentro do extractor. A finalidade destes dois métodos foi a de verificar se o frasco teria alguma influência num possível impedimento da passagem adequada dos organismos. No caso em que se colocou o frasco diretamente houve necessidade de colocar uma rede de 1 a 1,5 mm de modo a revestir a boca do frasco de cada réplica que ficou aberta (procedimento já explicado em cima).

III.3.6-Análise Estatística

Para cada espécie de colêmbolos (*C. sigillata* e *A. caecus*) foi avaliada a capacidade de reprodução dos colêmbolos em teste de reprodução, idêntico ao feito para *F. candida*, com duração de 28 dias apenas em solo artificial não contaminado. Foi realizada a comparação entre 3 e 4 semanas para *C. sigillata* e 4 e 6 semanas para *A. caecus*. Estes valores foram comparados por meio de um teste-*t* de amostras independentes.

A comparação do número de juvenis extraídos por *C. sigillata* e *A. caeucs*, por extracção no extractor MacFadyen em 24 horas e em 48 horas /método A e B, respectivamente), foi analisada estatisticamente através da

realização do teste- t de amostras independentes. Para a análise estatística foi considerando um α de 0,05 e os pressupostos de homogeneidade de variâncias e normalidade da distribuição dos dados foi avaliada através do teste de Barlett. Para todas as análises acima mencionadas, foi usado o Software “STATISTICA 7.0.”.

III.4-Resultados

III.4.1-Sincronização de culturas das espécies *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus*

Tabela 7 - Parâmetros analisados para culturas das espécies *C. sigillata* e *A. caecus*.

Parâmetros temporais	<i>A. caecus</i>	<i>C. sigillata</i>
Tempo de postura	12 ± 1 dias	10 ± 2 dias
Tempo de eclosão	21,5 ± 0,5 dias	9 ± 1 dias
Tempo de 1ª postura	9 ± 1 dias dias	10 ± 1 dias

No que respeita à espécie *A. caecus*, o tempo de postura observado foi de 12 dias; o tempo de eclosão foi de 21,5 ± dias dias; e o tempo da 1ª postura, variou entre os 8 e 10 dias.

No que respeita à espécie *C. sigillata*, observou-se um tempo de postura de 8 a 12 dias, um tempo de eclosão de 8 a 10 dias; e o tempo da 1ª postura de 10 dias (Tabela 7).

III.4.2-Distinção de sexo em culturas da espécie *Ceratophysella sigillata*

Foi notório o facto de que houve sempre postura, independentemente do fenótipo de colêmbolos isolado à nascença (arroxeados ou brancos).

Após uma análise exaustiva e contínua concluiu-se que, mesmo com a redução do número de colêmbolos por meio de cultura e com a separação dos colêmbolos arroxeados dos brancos, ainda assim continuou a verificar-se ovos, daí não ter sido possível confirmar-se a possibilidade de existência de separação de sexos.

III.4.3-Avaliação da durabilidade de ensaios ecotoxicológicos de reprodução para culturas das espécies *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus* terminando o ensaio com a técnica usada em ensaios de reprodução com *Folsomia candida*

Quanto à duração dos ensaios de reprodução testados, estes tiveram como base os resultados observados no que respeita aos parâmetros observados anteriormente (Tabela 7).

De acordo com os dados observados nenhum dos ensaios realizados se aproxima dos pressupostos de validade definidos na ISO 11267 para os testes de reprodução de colêmbolos *F. candida* (Tabela 8), nomeadamente no que toca à percentagem de sobrevivência de adultos. Estatisticamente não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos nas 4 e 6 semanas em *A. caecus* e nas 3 e as 4 semanas em *C. sigillata* (Tabela 8).

Tabela 8 - Número médio de indivíduos adultos sobreviventes e juvenis das espécies *C. sigillata* e *A. caecus* (\pm desvio padrão, $n=5$) contabilizados em ensaios de reprodução em laboratório usando diferentes períodos teste (3, 4 e 6 semanas) através da técnica de contagem com água e tinta azul.

<i>A. caecus</i>				<i>C. sigillata</i>			
4 semanas		6 semanas		3 semanas		4 semanas	
Adultos	Juvenis	Adultos	Juvenis	Adultos	Juvenis	Adultos	Juvenis
6 \pm 1	193 \pm 25	4 \pm 2	234 \pm 36	6 \pm 2	Não Observável	5 \pm 1	Não Observável

III.4.4-Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com *Ceratophysella sigillata* e *Arrhopalites caecus* recorrendo ao extractor de MacFayden

A contagem dos ensaios de reprodução através do extractor de MacFayden para as duas espécies de colêmbolos, tornou-se necessária muito por conta dos resultados obtidos na técnica de contagem de colêmbolos recorrendo à água com tinta azul, durante os ensaios de reprodução para determinação do período teste mais adequado (Tabela 8, onde para além dos

períodos mais adequados para ensaios de reprodução, também se pode analisar os resultados de organismos juvenis contados para a técnica de água com tinta azul para as espécies *A. caecus* e *C. sigillata*). Nos ensaios recorrendo à técnica da água com tinta azul nenhum dos pressupostos de validade definidos pela ISO para ensaios de reprodução com *F. candida* foi cumprido, nomeadamente a mortalidade foi superior a 20% (o que poderá ter acontecido eventualmente por falha do método de extracção). Além disso especificamente, os juvenis da espécie *C. sigillata* não puderam ser contados através do método usado nos ensaios em *F. candida* devido à falta de contraste dos juvenis à superfície da água, como se pode verificar na Tabela 8, em que não aparecem dados referentes ao número de juvenis no final do ensaio. A cor dos indivíduos da espécie *C. sigillata* confunde-se bastante com o solo e nem a tinta azul adicionada ajuda no contraste dos indivíduos com o meio. Já o mesmo não se passa com os indivíduos adultos que, pese embora se tenha de usar uma lupa, foram facilmente contados. No entanto, pode entender-se que o método de terminar ensaios com a adição de tinta azul para favorecer o contraste (à semelhança do que é feito em ensaios de *F. candida*) não resulta para a espécie *C. sigillata*.

Tabela 9 - Número médio de indivíduos (\pm desvio padrão; $n = 4$) de *A. caecus* e de *C. sigillata*, extraídos pelo extractor MacFadyen em 24h e 48h, em cada um dos métodos estudados A e B (para descrição detalhada dos métodos ver em cima).

<i>A. caecus</i>				<i>C. sigillata</i>			
Método A		Método B		Método A		Método B	
24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
4 \pm 1	4 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	18 \pm 1	18 \pm 1	12 \pm 3	12 \pm 1

O número de indivíduos da espécie *A. caecus* extraídos com o extractor MacFadyen ao final de 24 horas não é significativamente diferente do número

de indivíduos extraído após 48h ($p > 0,05$), podendo na verdade concluir-se que há um igual número de indivíduos extraídos.

Quanto à espécie *C. sigillata* pode observar-se que, independentemente do tempo de extração, basta 24 horas para que todos os indivíduos da espécie sejam extraídos, o que pode ser reforçado pela análise estatística ($p > 0,05$).

Já respeitante às diferentes técnicas (A e B), com base na Tabela 9, pode verificar-se a ausência de significância para a espécie *A. caecus*.

Quanto à espécie *C. sigillata*, pode observar-se na Tabela 9 uma maior eficiência de extração utilizando o método A em detrimento do uso do método B.

III.5-Discussão

III.5.1-Sincronização de culturas das espécies *C. sigillata* e *A. caecus*

Fazendo a comparação entre as duas espécies, é notório que a espécie *C. sigillata* apresenta parâmetros temporais do ciclo de vida (Tabela 7) mais curtos do que os da espécie *A. caecus* apenas no tempo de eclosão dos ovos, apresentando maior semelhança, quer no tempo de postura, quer no tempo de 1ª postura. No tempo de eclosão dos ovos existiram diferenças significativas, sendo o tempo de eclosão na espécie *C. sigillata* menos de metade em relação ao da espécie *A. caecus* (9 ± 1 dias e $21,5 \pm 0,5$ dias, respectivamente).

Comparando com a literatura consultada, no caso da espécie *C. sigillata*, e partindo dos dados que temos e que podem ser observados na Tabela 7 claramente existe um tempo de eclosão mais curto neste estudo comparativamente com o estudo de **Zettel (1994a,b)**, o que pode ainda assim ser justificado pelo facto de Zettel ter estudado o ciclo de vida de *C. sigillata* a uma temperatura de 10°C.

No caso da espécie *A. caecus*, existem muitas semelhanças face aos dados consultados na literatura. Quanto ao tempo de eclosão, o valor médio no estudo de **Moore et al. (2005)** (feito a valores de temperatura semelhantes a este estudo) menciona um valor de $22,2 \pm 5,2$ dias, variando de $16,2 \pm 6,3$ dias para a primeira geração (F1) e $28,8 \pm 5,6$ dias para a última geração do estudo (F4). Neste estudo foi observado um valor médio de $21,5 \pm 0,5$ dias, sendo estes dentro dos valores reportados na literatura face ao intervalo entre os valores intergeracionais, isto é, face aos valores observados nas gerações observadas nesse estudo. Quanto ao tempo de 1ª postura, **Moore et al. (2005)** apresenta valores entre $5,2 \pm 2,7$ e $20 \pm 2,8$ dias, havendo um aumento do

tempo consoante se evolui na geração. No presente estudo, os valores observados em média foram 9 ± 1 dias, estando ainda assim dentro do intervalo referente aos valores reportados na literatura.

III.5.2-Distinção de sexo nas culturas da espécie *C. sigillata*

Quanto ao tipo de reprodução da espécie *C. sigillata*, os resultados obtidos foram de todo inconclusivos. Será necessário realizarem-se mais estudos de forma a poder-se ter certezas do tipo de reprodução da espécie. No futuro será necessário apontar esforços a um estudo mais exaustivo da espécie apenas no que toca à sua reprodução, para a melhor entender. No entanto, e segundo **Zettel (1994a,b)**, o ciclo de vida desta espécie é bastante diversificado em diferentes fases, pelo que estudos futuros terão de ser realizados com base no que foi feito no presente estudo, isto é, lidando com organismos recém-nascidos, de modo a haver certezas quanto à fase do ciclo de vida em que estes organismos se encontram.

III.5.3-Avaliação do período teste mais adequado para ensaios de reprodução com *C. sigillata* e *A. caecus* terminando o ensaio com a técnica da água com a tinta azul

Quanto aos períodos teste avaliados para ensaios de reprodução, verificou-se que para os parâmetros temporais estudados em cada espécie, o número de adultos e de juvenis são semelhantes, tendendo no caso das duas espécies para os parâmetros temporais mais reduzidos (3 semanas para a espécie *C. sigillata* e 4 semanas para *A. caecus*). Contudo, como os parâmetros temporais observados (principalmente da espécie *C. sigillata*) não diferem muito dos verificados em *F. candida*, a escolha das 4 semanas de duração para as duas espécies será a melhor solução, sendo inclusive validado

estatisticamente e podendo ser considerado uma mais-valia atendendo à igualdade na duração dos testes para as três espécies (pese embora no caso da espécie *C. sigillata* as 3 semanas pudessem, ainda assim, ser igualmente representativas para a duração dos ensaios com esta espécie, não podendo deixar de ser considerada como eventual hipótese). Os resultados obtidos não cumpriram os requisitos estabelecidos no protocolo da ISO referente aos ensaios de reprodução com colêmbolos *F. candida*, nomeadamente no que toca à percentagem de mortalidade de adultos, que superou os 20%. No entanto, isso não tem de ser uma restrição, visto que se tratam de espécies diferentes e que os requisitos estabelecidos para *F. candida* poderão não ser forçosamente os mesmos para *A. caecus* e *C. sigillata*, sendo estes resultados uma mais-valia para a prossecução dos estudos com estas espécies. Ainda assim, ficou provado neste estudo que se torna inviável terminar um ensaio de reprodução para a espécie *C. sigillata* recorrendo à técnica da água com a tinta azul, devido à impossibilidade de contagem dos seus juvenis. Ainda assim, quanto à espécie *A. caecus* a contagem de juvenis foi possível, pese embora se tenha verificado o incumprimento dos requisitos estabelecidos no protocolo da ISO referente a ensaios de reprodução com *F. candida*.

III.5.4- Análise do método de extracção para a finalização de ensaios de reprodução com *C. sigillata* e *A. caecus* recorrendo ao extractor de MacFayden

Pese embora o método de extracção para finalização do ensaio de reprodução recorrendo ao extractor de MacFayden apenas tenha surgido devido à impossibilidade da técnica usada em ensaios de reprodução em *F. candida* usada na espécie *C. sigillata*, o método acabou por ser testado também em *A. caecus*. Quanto à espécie *A. caecus*, e após os resultados do

método de extracção através do extractor de MacFayden, é mais eficiente terminar o ensaio com o método de contagem aconselhado na ISO para *F. candida*, visto ser o método onde se recolhe maior número de espécimes. Quanto à espécie *C. sigillata*, é mais eficiente terminar o ensaio ecotoxicológico com o método de contagem standardizado para os testes com Ácaros (método de extracção com extractor de MacFayden), tendo para isto o cuidado de colocar a porção de solo proveniente do ensaio diretamente no extractor (método de extracção A – que consistiu em deixar o frasco invertido dentro do recipiente de extração). Este método acaba mesmo por ser uma mais-valia nesta espécie visto que não há possibilidade de proceder à contagem dos seus juvenis recorrendo ao método usado nos ensaios de reprodução em *F. candida*.

III.6-Conclusões

Este estudo, no conjunto das suas diversas fases, oferece um contributo ao conhecimento das espécies *A. caecus* e *C. sigillata*, desde a sua captura do meio ambiente até ao ensaio ecotoxicológico de reprodução propriamente dito.

Quanto à espécie *A. caecus*, apresenta tempos de postura bastante acessíveis para que se possa manipular em laboratório, pese embora o tempo de eclosão dos ovos seja mais elevado que, por exemplo, em *F. candida* (cerca de $21,5 \pm 0,5$ dias). Os ensaios de reprodução poderão realizar-se durante 4 semanas, sendo estatisticamente válido fazê-lo. A contagem pode ser feita à semelhança de como é feita em ensaios ecotoxicológicos de reprodução com *F. candida*. Os valores referentes ao tempo de eclosão e ao tempo de 1ª postura aqui obtidos vão de encontro à literatura consultada.

Quanto à espécie *C. sigillata*, apresenta tempos de postura e de eclosão dos seus ovos aceitáveis para que se possa manipular em laboratório. Os ensaios ecotoxicológicos poderão realizar-se durante 3 semanas, embora acabe por ser mais útil fazê-lo após 4 semanas, visto que se torna igual ao tempo nos ensaios com *F. candida* já realizados e com *A. caecus* sugeridos neste estudo. A contagem deve, neste caso, ser feita à semelhança da que é feita nos ensaios de reprodução com ácaros, *i.e.* deixando o frasco invertido dentro do recipiente de extração. O método usado em ensaios de reprodução com *F. candida* não é eficaz para esta espécie, devido à incapacidade de obtenção de contraste entre os colêmbolos e a superfície de água, o que impede uma contagem fiável dos mesmos em laboratório. O facto de possuir um ciclo de vida complexo que inclui diferentes fases de desenvolvimento e dormência que condicionam o seu comportamento, mesmo ao nível da

reprodução, tal como a incerteza no tipo de reprodução que realizam, pode vir a complicar seriamente a aplicação de ensaios de reprodução nesta espécie.

Como sugestões para trabalhos futuros, será importante a continuidade deste trabalho principalmente para se conseguir, na realidade, perceber se a forma de vida influencia na avaliação da toxicidade em espécies de colêmbolos.

III.7-Referências bibliográficas

- Byrne, Loren B. e Bruns, Mary Ann (2004). The effects of lawn management on soil microarthropods. The Pennsylvania State University, USA. Journal of Agricultural and Urban Entomology 21 (3): 150-156.
- Böerner, C. (1906). Das system der Collembolen, nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamberger Naturhistorischen Museums: Mitteilungen aus dem Naturhistorischen Museums Hamburg. v. 23, p. 147–188.
- Carl, J. (1901). Zweiter Beitrag zur Kenntnis der Collembolenfauna der Schweiz. Review Suisse Zoology 9:243-278.
- Cassagnau, P. (1986). The ecomorphosis of the Collembola. II. Phenological aspects and experimental analysis of the determinisms. Annual Society Entomology. France 22:313-338.
- Christiansen, K. (1966). The genus Arrhopalites (Collembola: Sminthuridae). In the United States and Canada: International Journal of Speleology, v. 2, p. 43–73.
- Hopkin, S.P (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). OUP Oxford. ISBN: 019158925X, 9780191589256
- ISO (1999). Soil quality—inhibition of reproduction of collembolan (Folsomia candida) by soil pollutants. ISO/DIS 11267. International Standardization Organization, Geneva.
- Moore, C., Saunders, P., Selby, G., Horton, H., Chelius, Marisa K., Chapman, Amanda e Horrocks, Rodney D. (2005). The distribution and life history of Arrhopalites caecus (Tullberg): Order: Collembola. In wind cave, South Dakota, USA. Journal of Cave and Karst Studies. 67(2):110-119.

- OCDE (2008). Guidelines for the testing of chemicals. No 226. Predatory mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) reproduction test in soil. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OCDE (2009). OCDE Guidelines for the testing of chemicals No. 232. Collembolan reproduction test in soil. Organisation for economic cooperation and development. Paris, France.
- Sachsse, J. (1957). Massenwanderungen von Collembolen. Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen. 6:54-55.
- Tullberg, T., (1871). Förtecking öfver svenska podurider: öfv. K. Vetakad. Förhandl. 28:143–155.
- Uzel, J. (1981). Supinuský zeme ceske. Vestnik Ces. Spol. Nauk, Math. Prirodov. 3-82.
- Zettel, U. & Zettel, J. (1994a). Development, phenology and surface activity of *Ceratophysella sigillata* (Uzel) (Collembola, Hypogastruridae). Acta Zoology Fennica. 195:150-153.
- Zettel, U. & Zettel, J. (1994b). Seasonal and reproductional polymorphism in *Ceratophysella sigillata* (Uzel) (Collembola, Hypogastruridae). Acta Zoology Fennica. 195:154-156.
- http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=469261
visitado a 25 de Agosto de 2015.
- http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=701453
visitado a 25 de Agosto de 2015.

Capítulo IV – Considerações Finais

IV.1-Conclusões finais

É de notar que as espécies de colêmbolos usadas actualmente em testes de reprodução padronizados são todas referentes a uma determinada camada do solo (camada hemiedáfica), pelo que todos os testes de reprodução realizados serão apenas representativos dessa área. Há de facto uma necessidade de continuar os estudos aqui apresentados, de modo a evoluir para se poder mais tarde usar uma maior diversidade de espécies teste representativas de diferentes grupos ecológicos e de diferentes extractos de solo para assim se obter resultados ecologicamente mais relevantes.

Relativamente ao primeiro objetivo do trabalho, é necessário ter especial atenção para o pesticida Montana® (s. a. glifosato), visto que os ensaios obtidos não permitiram obter qualquer toxicidade, o que não permite tirar conclusões quanto a este contaminante, não podendo haver comparação entre indivíduos *F. candida* de laboratório e de campo. Assim, há necessidade de repetir estes ensaios de modo a avaliar a sensibilidade dos colêmbolos de campo e laboratório a este contaminante. Quanto aos ensaios com indivíduos dessas duas culturas (de laboratório e de campo) para a exposição ao cobre e ao inseticida Dursban (s.a. clorpirifos), houve uma boa resposta havendo de forma geral resultados que se assemelham quando usadas as culturas de *F. candida* de laboratório e as de campo. Contudo, no caso da s.a. clorpirifos, os valores apresentaram uma discrepância um pouco maior que em relação ao contaminante cobre.

Referente ao estudo das espécies *A. caecus* e *C. sigillata* pode concluir-se que há um forte contributo ao conhecimento da biologia das espécies pouco usadas para este tipo de ensaios. Especificamente quanto à espécie *A. caecus*,

os parâmetros estudados são bastante acessíveis para se poder manipular em laboratório, pese embora apresente um elevado tempo de eclosão dos seus ovos (cerca de $21,5 \pm 0,5$ dias). Os ensaios de reprodução tal como o método de contagem podem realizar-se à semelhança do que se faz em *F. candida*

Quanto à espécie *C. sigillata*, apresenta igualmente parâmetros estudados bastante acessíveis para se poder manipular em laboratório, podendo os ensaios serem realizados igualmente em 4 semanas. Contudo, a técnica de contagem já não poderá ser igual à anterior, devendo recorrer-se ao método de extracção por extractor MacFadyen deixando o frasco invertido dentro do recipiente de extração, à semelhança do que já se faz para ensaios com ácaros. Ainda assim, o facto de possuir um ciclo de vida complexo que inclui fases de desenvolvimento e de dormência, condicionando o seu comportamento (inclusive ao nível da reprodução), pode criar aqui um entrave à realização de ensaios com esta espécie.

Independentemente dos resultados, devem ser realizados mais estudos para as espécies *A. caecus* e *C. sigillata* de modo a poder dar a adequada prossecução a este estudo, podendo este ser considerado apenas o início de uma nova investigação nesta área.



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior Agrária de Coimbra